LOKALISIERTE INTRAZELLULÄRE ABLEITUNGEN AUS DEN AXONEN DER 8. SEHZELLE DER FLIEGE CALLIPHORA ERYTHROCEPHALA

MATTI JÄRVILEHTO

1971

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546017_0012

Lokalisierte intrazelluläre Ableitungen aus den Axonen der 8. Sehzelle der Fliege Calliphora erythrocephala

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Matti Järvilehto

München
1971

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Autrum

Mitberichterstatter: Univ.-Doz.Dr. P. Bruckmoser

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.1971

Herrn Professor Dr.Dr.h.c. H. Autrum fühle ich mich für sein stets förderndes Interesse an der Arbeit und für die Bereitstellung von Institutseinrichtungen sehr zu Dank verpflichtet.

Für die Anregung zu dieser Arbeit und für die zahlreichen Diskussionen danke ich herzlich Herrn Dr. F. Zettler.

Die Arbeit wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Präparation	6
Elektroden und Elektronik	8
Reizanordnung und Versuchsablauf	8
Lokalisationsmethode:	
Lokalisation der Zelle und der Ableitelektrode	11
Eigenschaften der Injektionsfarbe und die Entwicklungsarbeit	11
Einfrieren des intakten Präparates	15
Gefriertrocknung	17
Herstellung der mikroskopischen Präparate	24
Fluoreszenzmikroskopie	26
Ergebnisse:	
Identifizierung der Zelle und die Lokalisation der Ableitstelle	28
Potentialformen	28
Kennlinien	32
Latenzen	34
Winkelabhängigkeit	37
Diskussion:	
Technische Probleme der Lokalisation	41
Probleme der Interpretation	42
Problematik des Einfrierens lebender Zellen	42
Diskussion der Meßergebnisse	45
Zusammenfassung	49
Literaturverzeicnis	50

Einleitung

Die schnell fliegenden Insekten haben ein hochentwickeltes visuelles System. Die Komplexaugen sind groß und bedecken den größten Teil des Kopfes.

Um den Funktionsmechanismus des Komplexauges der Insekten zu verstehen, ist es wichtig sowohl die exakte Projektion der Sehelemente auf die höheren Zentren als auch die für jede Zelltype charakteristischen Potentialformen zu kennen. Die Bahnen der Haupttypen von Neuronen und Sehzellen wurden in großen Zügen schon im Jahre 1915 von Cajal und Sanchez aufgeklärt. Sie fanden im optischen Lobus drei synaptische Regionen: externe Plexiforme, interne Plexiforme Schicht und das Neuropil des optischen Lobus. In der neueren Literatur werden diese als Lamina, Medulla und Lobula bezeichnet (Bullock und Horridge 1965). In zahlreichen Publikationen wurde die genauere Projektion der Sehbahnen zwischen verschiedenen synaptischen Regionen aufgehellt (Trujillo-Cenoz und Melamed, 1962; Trujillo-Cenoz, 1965; Braitenberg, 1967; Strausfeld, 1970; Horridge und Meinertzhagen, 1970; Trujillo-Cenoz und Melamed, 1971; Boschek, 1971).

Die Komplexaugen bestehen aus kleinen Einzelaugen, Ommatidien, die nach außen von einer Cornealinse abgeschlossen werden. Ein Ommatidium setzt sich aus acht Sehzellen zusammen, die von den Sehzellen der Nachbarommatidien durch Pigmentzellen optisch abgeschirmt sind. Jede Sehzelle besitzt eine spezielle Struktur, das Rhabdomer, in dem das Sehpigment lokalisiert ist. Cornealinse und Kristallkegel bilden einen bestimmten, kleinen Umweltbereich auf das distale Ende eines Rhabdomers ab. Das einfallende Licht wird durch den Sehfarbstoff absorbiert und erzeugt über chemische Zwischenprozesse auf der Zellmembran eine Depolarisation, das sog. Belichtungspotential. Dieses Potential wird über die Axone der Sehzellen an höhere Zentren des Nervensystems weitergeleitet.

Abb. 1.

Schematische Darstellung der vertikalen Elemente der Retina bei Dipteren. Die Abkürzungen bedeuten:
Bm Basalmembran; C Cornealinse; Ch I, Ch II Chiasmata; Gz Gliazelle; Kk Kristallkegel; L_1-L_4 monopolare Neuronen; Lg Lamina ganglionaris; Lo Lobula; Lp lobular Plate; Me I Medulla externa; Me II Medulla interna; Pz Pigmentzelle; Sz sempersche Zelle; Sz_{1-6}, Sz_7, Sz_8 Sehzellen.

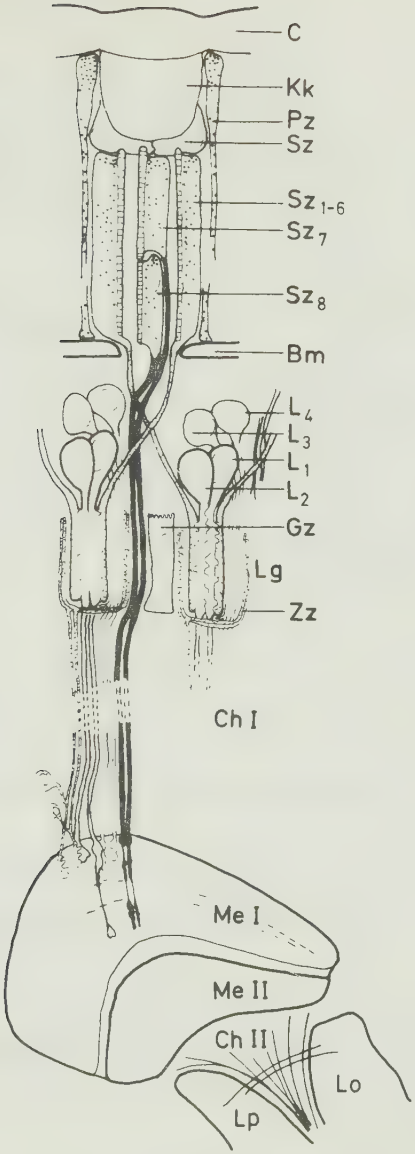

C
Kk
Pz
Sz
Sz 1-6
Sz 7
Sz 8
Bm
L 4
L 3
L 1
L 2
Gz
Lg
Zz
Ch I
Me I
Me II
Ch II
Lo
Lp

Abb. 1.

Die Rhabdomere eines Ommatidiums bei der Fliege bilden eine rhombische Figur um zwei zentrale Rhabdomere, die zu den 7. und 8. Sehzellen gehören, deren Rhabdomere in "Tandem"-Anordnung hintereinander gelagert sind und gemeinsam einen Lichtleiter bilden. Die obere, siebte Sehzelle wird superior und die untere inferior genannt (Trujillo-Cenoz, 1965). Die Sehzellen sind in bestimmter Weise von eins bis acht numeriert (Dietrich, 1909).

Die Axone der Retinulazellen laufen durch die Basalmembran und enden im 1. optischen Ganglion, der Lamina ganlionaris. Das Bündel der Axone von den Sehzellen 1.-6. spaltet sich gleich nach der Basalmembran auf und die einzelnen Fasern, die aus verschiedenen Ommatidien stammen, bilden wieder Gruppen in der Lamina, die sog. Neuro-Ommatidien (häufig auch "optic cartridges" genannt, Cajal und Sanchez, 1915). Zu einer Cartridge gehören neben den Sehzellen auch noch mehrere Typen von Neuronen.

Die Axone der 7. und 8. Sehzellen laufen durch die Lamina ohne in synaptischen Kontakt mit anderen Elementen zu treten. Erst in der Medulla, die die zweite neuronale Schaltstelle ist, werden Synapsen in zwei verschiedenen Schichten gebildet, mit Elementen unterschiedlichen Ursprungs, deren Aufbau und Funktion nicht näher bekannt ist.

In der Lamina wurden bisher vier unterschiedliche Typen von monopolaren Neuronen (L_1 - L_4), die zu einer optischen Cartridge gehören, gefunden. Von diesen senden alle einen dünnen Axon in die Medulla. Außerdem gibt es noch in der Lamina Zentrifugalzellen, Horizontalzellen und Amakrinzellen, deren synaptische Kontakte innerhalb einer und zwischen verschiedenen Cartridges noch ungeklärt sind.

Im Chiasma findet man Gruppen von acht verschiedenen Fasern, die zu einer Cartridge gehören (Trujillo-Cenoz, 1971): Die Axone der vier monopolaren Neuronen (L_1 - L_4), die durchziehenden Axone der

zwei exzentrischen Sehzellen und die Axone der zwei zentrifugalen Zellen. Von diesen Tatsachen muß man ausgehen, wenn man die elektrophysiologischen Messungen im Chiasma durchführen will.

In mehreren Arbeiten wurden bereits die Potentiale, die aus der Retinulaschicht stammen mit denen aus der Lamina verglichen (Scholes, 1969; Zettler und Järvilehto, 1970; Mote, 1970a, 1970b). In allen Arbeiten wurden zwischen Lamina und Retinulaschicht Unterschiede gefunden, die durch die passive Ausbreitung der Signale erklärt wurden. Solche typischen Unterschiede der Laminapotentiale sind das Verschwinden des ursprünglich in der Retinulaschicht vorhandenen Rauschens und ferner die Abnahme der Potentialamplitude.

Die siebte und achte Sehzelle unterscheiden sich von den übrigen sechs durch ihren wesentlich längeren Axon, der bis in die Medulla läuft. Da man bisher in der Retinulaschicht nur einen Typ von Potentialen gefunden hat, ist anzunehmen, daß Potentiale aus den 7. und 8. Sehzellen dieselbe Form haben wie die aus den Sehzellen 1. - 6. Inzwischen ist bekannt, daß die Potentiale der Sehzellen 1. - 6. mit erheblichem Dekrement passiv weitergeleitet werden (Scholes, 1969; Loannides und Walcott, 1971). Nimmt man an, daß die Potentiale der 7. und 8. Sehzellen in gleicher Weise fortgeleitet werden, so ist es schwer vorstellbar, daß am Axonende in der Medulla noch nennenswerte Potentialamplituden ankommen. Eine andere Möglichkeit wäre die Umkodierung auf Spikefolgen, die dann in bekannter Weise dämpfungsfrei weitergeleitet würden.

Um die Frage beantworten zu können, war es notwendig eine präzise Lokalisationsmethode zu entwickeln, die nach der Ableitung sowohl die Zelle als auch die Ableitelektrode zu zeigen erlaubte,

Material und Präparation

Als Versuchstiere wurden weibliche Schmeißfliegen, Calliphora erythrocephala Meig., benutzt, deren Alter zwischen 7-18 Tage nach dem Schlüpfen war.

Der Kopf wurde abgeschnitten, der Rüssel entfernt. Danach wurde er durch das Rüsselloch auf eine in der Präparatschale befindlichen Silbernadel aufgesteckt und mit einer Mischung von Bienenwachs und Kolophonium festgeklebt. Die Silbernadel diente auch gleichzeitig als indifferente Elektrode.

Die Ableitungen wurden im linken Auge der Fliege durchgeführt. Die Abb. 2. zeigt die Ableitsituation mit der Elektrode während des Versuches. Für die Ableitelektrode wurde am Rande des Auges, ungefähr in der Mitte, an der Stelle des Haarsaumes ein Loch gebohrt, das dann mit Vaselin zugeschmiert wurde, um die Austrocknung im Kopf zu verhindern. Auf der anderen Seite des Kopfes wurde ein größeres Loch gemacht, das offen blieb. So wurde eine Anoxie verhindert.

Während der Versuche war die Temperatur zwischen 22-26^{o} C und die relative Feuchtigkeit 45 - 60 %.

Für die Ableitung wurde die Glasmikroelektrode durch das mit Vaselin zugeschmierte Loch ins Gewebe immer in einem bestimmten Winkel zur Hinterhauptsebene des Kopfes eingestochen. Diesen Winkel konnte man variieren, je nach dem aus welcher Stelle des Gewebes die Ableitungen gewünscht wurden.

Abb. 2.

Der Fliegenkopf ist für die Ableitung auf eine Silbernadel aufgesteckt. Von rechts kommt eine Glasmikroelektrode durch das ins Chitin gebohrte Loch am Augenrand ins Auge hinein.

Elektroden und Elektronik

In den Ableitungen wurden Glasmikroelektroden benutzt, deren Länge ca. 22 - 24 mm vom Schaft bis zur Spitze war. Der Spitzendurchmesser war unter 0,1 µ und die Elektroden wurden mit der Methode von Zettler (1970) mit einer 5 % Farblösung (Procion Yellow M-4R) gefüllt. Der Widerstand der Elektroden war zwischen 180-250 Megohm, gemessen gegen Ringer-Lösung.

Die Potentiale wurden mit einer Kamera (Fa. Tönnies, Freiburg) vom Bildschirm des Oszillographen (Tektronix 565) aufgenommen. Der verwendete Kathodenfolger wurde 1970 publiziert (Autrum, Zettler und Järvilehto). Die Bandbreite war genügend groß, um auch die möglicherweise existierenden Spikes zu registrieren.

Reizanordnung und Versuchsablauf

Als unmittelbare Lichquelle für das Auge dient die Austrittsöffnung eines Lichleiters, die vom Auge aus gesehen unter einem Öffnungswinkel von ca. 2° erscheint. Die Lichtquelle kann bei gleichbleibendem Abstand vom Auge in eine beliebige Richtung geschwenkt werden. So läßt sich leicht die optische Achse der untersuchten Sehzelle lokalisieren, und der nicht interessierende Augenbereich wird wegen der Schirmpigmente nicht gereizt (Washizu, Burkhardt und Streck, 1964). Die eigentliche Lichtquelle besteht aus einer 150 W Xenon-Hochdrucklampe, deren Brennfleck mittels einer Linse auf den Eingang des Lichtleiters abgebildet wird. Mit einem Satz von Graufiltern (Zeiss, Oberkochen) läßt sich die auf das Auge fallende Lichtintensität um sechs Zehnerpotenzen in Stufen von jeweils 50 % abschwächen. Zur Erzeugung von sprungförmigen Lichtänderungen dient der Compurverschluß.

Die Beleuchtungsstärke am Ort des Präparates wurde mit einem Luxmeter (Lunasix, Gossen) gemessen. Die maximal erreichbare Beleuch-

tungsstärke beträgt ca. 10.000 Lux. Gereizt wurde mit unbuntem Licht. Die Abb. 3. zeigt den Spektralgang des Reizlichtes.

Um in eine Zelle hineinzukommen wurden kleinere positive und negative Stromstöße ($\pm 10^{-9}$ - 10^{-7} A) als Hilfe verwendet oder vorsichtige Erschütterungen mit kleinem Metallhammer auf die Metallgrundplatte. Nachdem eine Sehzelle angestochen wurde, hatte man den Lichtleiter solange geschwenkt, bis er in der optischen Achse dieser Zelle lag. Hierbei wurde mit Flimmerlicht kleiner Intensität gereizt. Nachdem die Zelle so gefunden war, ließ man sie 5-10 Minuten dunkeladaptieren. Dann erst wurden die gewünschten Messungen durchgeführt.

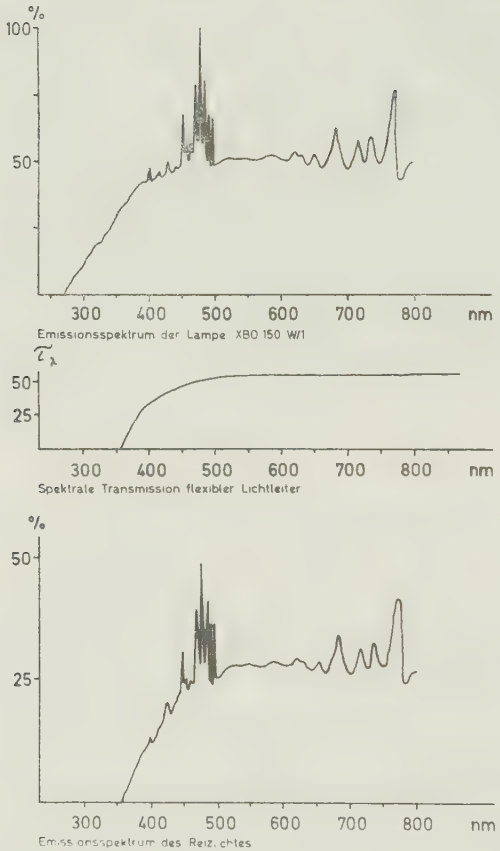


Abb. 3.

Die spektrale Zusammensetzung des Reizlichtes.

Lokalisation der Zelle und der Ableitelektrode

Nach Abschluß des Meßprogramms folgen fünf verschiedene präparative Schritte:

1. Die Injektion der Farbe in die Zelle durch Elektroforese.
2. Das schockartige Einfrieren des Präparates samt der Elektrode.
3. Die Gefriertrocknung des Präparates.
4. Das Einbetten und Schneiden des Präparates.
5. Das Betrachten der Schnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Mit der Lokalisation will man zwei Ziele erreichen: erstens die Zelle, von der die Ableitungen stammen, identifizieren, ihre morphologische Struktur und ihre Lage im Neuronennetz sichtbar machen; zweitens die genaue Ableitstelle in der Zelle nachweisen. Es ist ja bekannt, daß eine Zelle verschiedene Potentialtypen liefern kann, wie z.B. ein Neuron, das im Axon Spikes und in den Dendriten langsame Potentiale liefert. Mit der Farbinjektion soll das zuerst genannte Problem gelöst und durch das Einfrieren des Präparates die Elektrodenspitze fixiert werden um so die Ableitstelle nachweisen zu können.

Die Eigenschaften der Injektionsfarbe und die Entwicklungsarbeit

Eine gute Markierungsfarbe sollte folgende Eigenschaften haben. Sie soll ein guter elektrolytischer Leiter sein, damit der Widerstand der Elektroden nicht zu hoch wird. Die Farbe soll sich in der ganzen Zelle verteilen, jedoch nicht durch die Membran austreten. Die Farbe muß auch sehr intensiv sein, damit man noch kleinste Mengen nachweisen kann. Sie darf nicht toxisch sein und im besten Fall nicht die Eigenschaften der Zelle verändern. Der benötigte Injektionsstrom muß genügend klein (10^{-7} - 10^{-8} A) sein, damit die Elektrode bei der Injektion nicht die Zellmembranen zerstört.

Für die Farbinjektion wurde von früheren Autoren Kristallviolett (MacNichol Jr. und Svaetichin, 1958), Lithiumkarmin (Mitarai, 1960) verwendet. Von Oikawa et al. (1959) wurden Silberionen vorgeschlagen, die man dann durch Reduktion mit Natriumsulfat nachweisen könnte. Alle diese Farben erfüllen jedoch die genannten Bedingungen nur teilweise und waren eigentlich nur für extrazelluläre Markierungen geeignet. Die Farbflecken waren zu groß (über 100 µ) und bei kleineren Injektionsmengen nicht sichtbar.

Einen Fortschritt bildet die intrazelläre Farbstoffelektroforese durch Methylblau oder Fast green, die Thomas und Wilson (1966) bei Rückenmarks-Motoneuronen der Katze angewendet haben. Diese Methode wurde von Sterc et al. (1968) durch die Plastik-quetsch-Methode verbessert. Nun konnte man zwar die einzelnen Somata von Motoneuronen lokalisieren, aber ihre Strukturen blieben unklar. Etwas bessere Ergebnisse erhielten Kaneko und Hashimoto (1967) durch Niagara sky blue 6 B, dessen Intensität so hoch war, daß man auch einige andere Zellstrukturen erkennen konnte. Die hierbei verwendeten Ströme von mehreren Mikroamper machen jedoch die Lokalisation etwas bedenklich. Wie z.B. Werblin und Dowling (1969) beschreiben, war nach der Injektion die Elektrodenspitze in einer Länge von mehreren µm verschwunden. Für die Injektion wurde eine Spannung von 400 V angelegt. Das sprengte die dünnen Glaswände der Elektrodenspitze. Wenn aber durch die Injektion die Glasspitze zerstört wird, dann ist es ziemlich fragwürdig, ob die Farbe auch in der Zelle nachgewiesen wird, an der gemessen wurde.

1968 wurden von Stretton und Kravitz zusammen mit der Firma ICI Farben systematisch untersucht. Es wurde festgestellt, daß einige besonders intensive Fluoreszenzfarben kovalente Bindungen mit den Makromolekülen einer Zelle bilden. Dies ist von besonderer Bedeutung für die Forderung, daß die in eine Zelle einmal injizierte Farbe nicht mehr herausdiffundieren darf. Einige Procion-Farben haben

diese Eigenschaften und es wurden 58 verschiedene Farben dieses Typs ausprobiert, von denen die folgenden fünf besten, Brown H3R, Brilliant Red H3BN, Navy Blue H3R, Yellow M4R und Brilliant Red M8B ausgesucht wurden. Die Farben sind Zyanurinsäure-Chloridderivate, die leicht mit den Kohlenhydraten und Proteinen kovalente Bindungen bilden. Im Normalgebrauch werden diese Farben zum Färben von Textilien verwendet.

Die für die Zellinjektion beste Farbe war Procion-Yellow M-4R. Sie wird bei 460 nm angeregt und die Emission liegt bei 550 nm. Sie ist kaum toxisch für die Zelle, denn noch vier Stunden nach der Injektion in ein Motoneuron wurde Ruhepotential und Spike-Aktivität gemessen. Die Farbe dringt nicht durch die Zellmembranen nach außen und ihre Intensität ist außerordentlich kräftig. Mit ihr konnten auch die feinsten Verästelungen einer Zelle nachgewiesen werden.

Die Elektroden wurden mit einer 4-5 %igen wässrigen Farblösung gefüllt. Der Widerstand bei Stretton und Kravitz war ca. 10 Megohm, d.h. die Elektrodenspitze war verhältnismäßig groß. Die Injektion wurde mit Strömen von $1 \cdot 10^{-8}$ - $5 \cdot 10^{-8}$ A in Impulsen von 0,5 Sec pro Sekunde durchgeführt.

Die benötigte Injektionszeit war ca. 30 Min. und die Diffusionszeit bei $+4^{\circ}$ C gewöhnlich eine Nacht. Die Reaktion der Farblösung war leicht sauer. Von Stretton und Kravitz wurde für die Fixierung eine Lösung von Glutaraldehyd (6 %) und Akrolein (2 %) bei pH 4,0 benutzt. Nach der Fixierung wurde entwässert und in Epon 812 eingebettet. Nach dieser Methode konnte man jedoch nicht mehr die Ableitstelle in der Zelle nachweisen.

Diese Methode wurde mit Erfolg von Kaneko (1970, 1971), Davis (1970) Bentley (1970), Steinberg und Schmidt (1970), Milburn und Bentley (1971) mit kleineren Veränderungen angewendet. Die Ausbeute war ziemlich gering. z.B. beschreibt Kaneko, er hätte von ca. 250 Injek-

tionen nur 38 wiedergefunden, also ca. 15 %.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls die Methode von Stretton und Kravitz in ihren Hauptzügen verwendet. Durch einige Veränderungen kann man die Ausbeute der markierten Zellen ganz erheblich steigern.

Die Farbe enthält manchmal als Verunreinigung kleine Fett- oder Öltröpfchen, die man zuerst mit einer Aether-Lösung auswaschen muß. Diese Öltröpfchen können nämlich die feine Spitze verstopfen und die Injektion verhindern. Die Farbe wird nach dem Waschen getrocknet und in destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wird bei der Elektrodenfüllmethode von Zettler (1970) zweimal durch eine Bakteriennutsche filtriert. Dabei bleiben auch die feinsten unlöslichen Partikel zurück, die Schwierigkeiten bei der Injektion verursachen können.

Um überhaupt in die 1-2 µ dünnen Axone hineinzukommen, müssen die Elektrodenspitzen so fein wie möglich sein. Der kleine Spitzendurchmesser von 0,1 µ bringt als Nachteil einen ziemlich hohen Widerstand von ca. 180-250 Megohm mit sich. Während der Injektion wird der Elektrodenwiderstand beobachtet. Schwankungen des Elektrodenwiderstandes treten immer dann auf, wenn die Elektroden verunreinigt sind. Der Widerstand kann so hohe Werte annehmen, daß eine Injektion nicht mehr möglich ist. Ebenso wichtig ist auch die ständige Kontrolle der Antwort-Potentiale. Bleibt das Antwortpotential während der Injektionspausen voll erhalten, so ist man sicher, daß die Elektrode in der Zelle bleibt.

Für die hier vorliegenden Versuche wurde ein Strom von $-5 \cdot 10^{-9}$ A über eine Zeit von einigen Minuten injiziert. Die Zeit für die Ausbreitung der Farbe in der Zelle war ca. 30 Minuten. Durch Einfrieren des Präparates kann man sehr kleine Mengen der Farbe nachweisen, und damit die Empfindlichkeit der Methode erheblich steigern. Bei den üblichen Fixiermethoden kann man nicht verhindern, daß ein Teil der Farbe ausgewaschen wird.

Das Einfrieren des intakten Präparates

Der entscheidende Vorteil der Gefrierfixierung beruht auf der Tatsache, daß nach dem Einfrier-Auftau-Vorgang die Zellen oder mindestens ein Teil von ihnen lebendig bleiben. Das bedeutet, daß man durch Einfrieren Gewebe ohne Artefakte oder nur mit geringen Veränderungen fixieren kann. Mehrere Pflanzen- und Tierorganismen können auch in der Natur den gefrorenen Zustand überleben. Moore (1964) hat elektronenmikroskopisch an Hefezellen gezeigt, daß das Einfrieren kälteempfindlicher Objekte unter bestimmten Umständen nicht zum Absterben führt.

Der Ablauf des Gefriervorganges in den Zellen wird sowohl von äußeren als auch von objektgebundenen Faktoren bestimmt: Die Variation der äußeren Faktoren z.B. der Gefriergeschwindigkeit, der Endtemperatur des Gefriervorganges und der Anwendung von Frostschutzmitteln, ist geeignet, Mittel und Wege für die Gefrierfixation lebender Zellen zu finden.

In den ersten Versuchen zur Gefrierfixierung wurde flüssiger Stickstoff als Gefriermittel benutzt (Gersh, 1932). Bei der Berührung eines warmen Körpers mit einem flüssigen, tief siedenden Gas entsteht jedoch ein das Objekt umhüllender Gasmantel (Leidenfrost'sches Phänomen), der den Wärmekontakt verschlechtert und damit die Abkühlung verzögert. Man ist deshalb dazu übergegangen, sehr viel höher siedende, organische Gase als Kontaktmedien, sog. Kryogene, zu verwenden wie z.B. Propan (Sp. -44,5° C) oder Freon 12. Die Handhabung dieser Mittel ist jedoch ziemlich umständlich, weil man sie wegen des niedrigen Siedepunktes entweder in Druckflaschen oder bei niedrigen Temperaturen (bei -80° C) aufbewahren muß. Isopentan hat einen höheren Siedepunkt (+27,8° C). und ist somit leichter zu behandeln, jedoch hat es auch einen verhältnismäßig hohen Gefrierpunkt (-158,5° C) und das bedeutet wiederum langsameres Einfrieren.

Außerdem sind die oben erwähnten Kryogene ziemlich leicht entzündbar und können mit Sauerstoff explodieren.

Das bestmögliche Kryogen für schnelles Einfrieren ist flüssiges Helium II, d.h. Helium bei ungefähr 1° K. Helium II zeichnet sich hauptsächlich durch Superleitfähigkeit aus, die viele 1000mal besser ist als bei metallischem Kupfer. Das Leidenfrost'sche Phänomen wird dadurch (Fernandez-Moran, 1960) ausgeschlossen, so daß die extrem tiefe Temperatur einen äußerst raschen Wärmeentzug bewirkt. Die Methode ist allerdings kompliziert, sehr teuer und nur ungenügend reproduzierbar, so daß sie bis heute kaum verwendet wird.

Der Neuling unter den Kryogenen ist Halon, Halogenkohlenwasserstoff (Tiffe, Zelles, Paucksch und Ernst, 1970). Es ist eine eutektische Mischung von zwei Stoffen (CF_2-ClBr 52% und CF_2Br_2 48 %), deren Schmelzpunkt bei -165° C und deren Siedepunkt bei -4 - $+24^{\circ}$ C liegt. Die fertige Mischung kann man ohne Schwierigkeiten im Kühlfach des Eisschranks aufbewahren. Sie ist leicht zu behandeln und ist nicht entzündbar. Das Gemisch wird im flüssigen Stickstoff fest, jedoch bildet es keine störenden Kristalle.

Die hier untersuchten Präparate wurden mit Halon eingefroren. Das Gemisch wurde in einem Glasrohr zunächst mit flüssigem Stickstoff gefroren. Nimmt man das Rohr aus dem flüssigen Stickstoff heraus, so beginnt nach einiger Zeit das Kühlmittel zu schmelzen und läuft aus dem Rohrende heraus. Um den Ausfluß möglichst gleichmäßig zu machen, wird zur besseren Wärmeverteilung in das Rohr dünner Kupferdraht gestopft. So war es möglich einen ruhigen Fluß von tiefgekühltem Halon solange über das Objekt laufen zu lassen, bis das Präparat fest gefroren war und die Elektrode abgebrochen werden konnte. Das Präparat kann dann in flüssigen Stickstoff überführt, in gewünschter Weise weiterbehandelt und beliebig lange aufbewahrt werden.

Gefriertrocknung

Gefriertrocknung heißt Entfernung von Wasser aus gefrorenem Gewebe durch Sublimation, d.h. durch direkten Übergang von Eis in Dampf unter Umgehung des flüssigen Aggregatzustandes. Die Durchführbarkeit dieses Verfahrens beruht auf den in Abb. 4. gezeigten physikalischen Eigenschaften des Wassers.

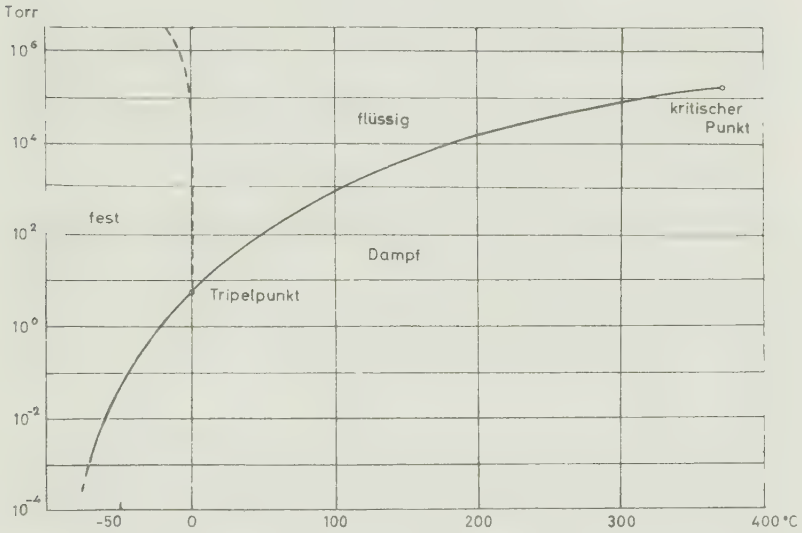


Abb. 4.

Abhängigkeit der Aggregatzustände des Wassers von Druck und Temperatur.

Um vom festen Aggregatzustand unmittelbar in den gasförmigen überzugehen (Sublimation), müssen die Temperatur unterhalb 0° C und der Wasserdampfdruck unter 4,6 Torr sein (Tripelpunkt). Bei höherem

Wasserdampfdruck ist die Sublimation nicht mehr möglich. Aus Eis treten Wasserdampfmoleküle so lange in die Umgebung aus, bis sich dort ein bestimmter Gleichgewichtsdampfdruck eingestellt hat. Die Höhe dieses Gleichgewichtsdampfdruckes oder Sättigungsdampfdruckes hängt von der Temperatur im Eis, d.h. im Gewebe ab und ist durch die ausgezogene Kurve in der Abb. 4. dargestellt.

Um also die Gefriertrocknung erfolgreich durchzuführen, sind im Wesentlichen zwei Voraussetzungen zu berücksichtigen: Die Temperatur des Gewebes muß unter dem eutektischen Punkt bleiben und es muß dafür gesorgt werden, daß die aus dem Gewebe herauskommenden Wassermoleküle wegtransportiert werden, damit kein Dampfgleichgewicht entstehen kann.

Im einfachsten Fall sieht eine Gefriertrocknungsapparatur folgendermaßen aus: 1) Ein geschlossener Raum, in dem die Präparate bei genügend niedriger Temperatur zum Trocknen aufbewahrt werden und 2) eine Vorrichtung, um die Wasserdampfmoleküle abzutransportieren.

Den Wasserdampftransport kann man im Prinzip auf drei verschiedene Weisen verwirklichen. 1) Die abdampfenden Wassermoleküle werden mit einer leistungsfähigen Vakuumpumpe direkt weggepumpt, 2) sie werden in einer Kühlfalle gefangen (Eiskondensator), 3) sie werden mit einem hygroskopischen Stoff absorbiert. Es ist selbstverständlich auch möglich, verschiedene Kombinationen anzuwenden.

In dieser Arbeit wurde die in Abb. 5. dargestellte Gefriertrocknungsanlage verwendet. In Abb. 6. ist diese Anlage in einer Schemazeichnung dargestellt. Die Anlage besteht aus drei Hauptteilen, aus einem Trocknungsraum (7), aus einem Eiskondensator (4) und aus einer Vakuumpumpe (1).

Der Trocknungs_raum (7) für das Objekt (12) taucht in die größere Kryokanne (ca. 10 Liter), die eine Kältemischung von -65° C enthält.

Diese besteht aus einer Lösung von Trockeneis und Nonan.

Der Eiskondensator taucht in die zweite Kryokanne. Um die Wassermoleküle zu fangen und ein Diffusionsgefälle zu erzeugen, wird in dieses Kryogefäß flüssiger Stickstoff eingefüllt. Der Wasserdampfdruck von Eis bei -190° C liegt bei ca. 10^{-15} Torr und der vom Gewebe bei -60° C bei ca. $7 \cdot 10^{-3}$ Torr. Das Diffusionsgefälle ist so groß, daß nur die Diffusionszeit der Wassermoleküle vom Gewebe bis zum Eiskondensator die Trocknungsdauer bestimmt. Um diese Zeit möglichst kurz zu halten, ist es wichtig, daß in der Apparatur ein verhältnismäßig gutes Vakuum herrscht. Das Vakuum wurde hier durch eine Ölrotationspumpe (1) erzeugt, mit der man einen Druck von $3 \cdot 10^{-3}$ Torr erreichen kann.

Die Bauteile der Apparatur wurden von der Fa. Leybold-Heraeus, Köln, bezogen.

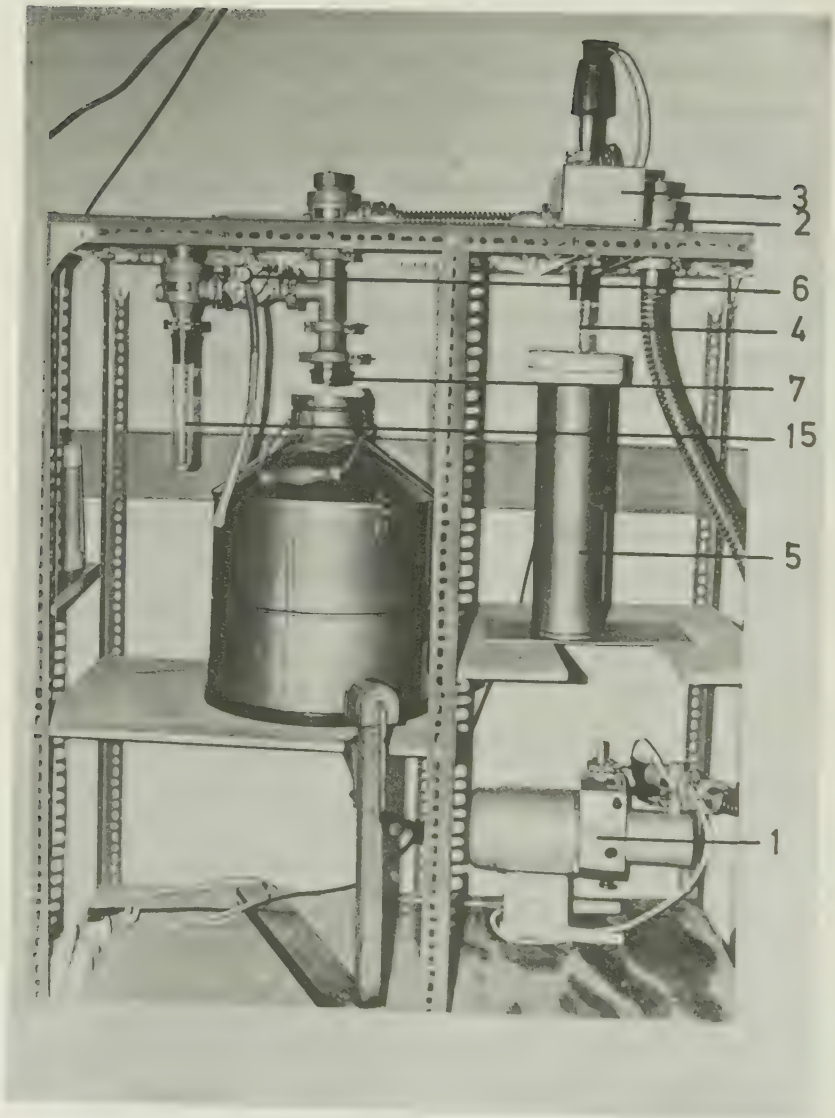


Abb. 5

Gefriertrocknungsanlage im Gebrauch. Die Nummernhinweise sind in der Abb. 6. angegeben.

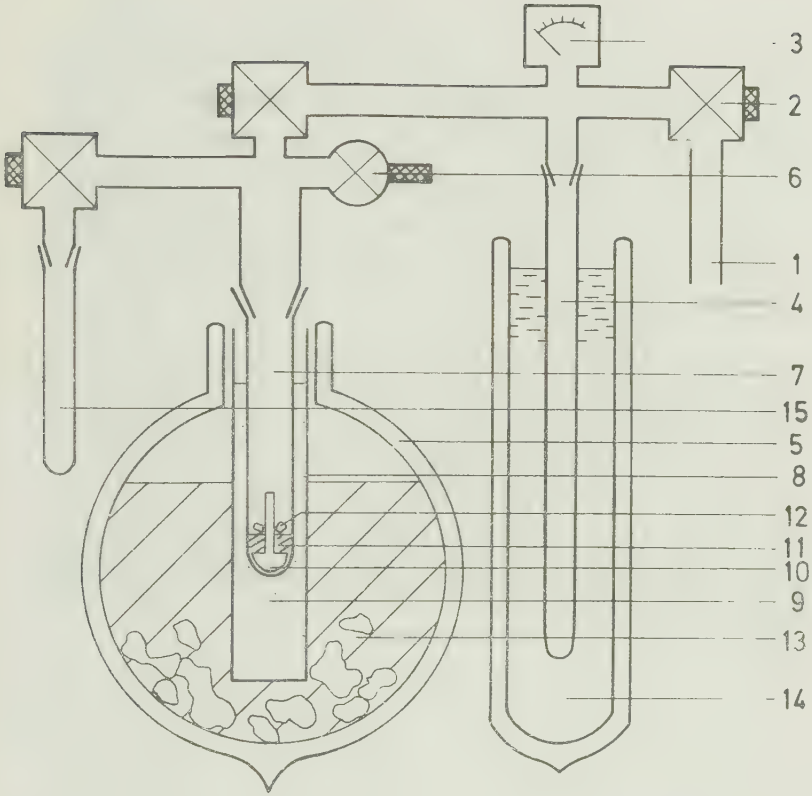


Abb. 6.

Schemazeichnung der in der Abb. 5. dargestellten Gefriertrocknungsanlage. 1. Vakuumpumpe, 2. Eckventile (3 Stk.), 3. Druckmesser, 4. Eiskondensator, 5. Kryokannen, 6. Feinregulierungsventil, 7. Trocknungskammer, 8. Ausgleichsrohr, 9. Ausgleichsflüssigkeit (Aethanol), 10. Metallstück, 11. entgastes Wachs, 12. Präparate in Gelatinekapseln, 13. Kältemischung (Nonan + Trokkeneis), 14. flüssiger Stickstoff, 15. Zusatzrohr.

Die Apparatur ist relativ einfach zu bedienen. Als erstes wird das Wachs im Trocknungsraum entgast und dann abgekühlt. Die in den Gelatinekapseln befindlichen Präparate werden mit etwas flüssigem Stickstoff hineingeschüttet und gleich danach wird gepumpt. Die Fliegenköpfe, ohne Kopfhinterwand, läßt man ca. 3-4 Tage unter Vakuum von $7 \cdot 10^{-3}$ Torr trocknen. Falls das Vakuum schlechter ist, muß man mit längerer Trocknungsdauer rechnen. Die Temperatur in dem größeren Kryogefäß hält ungefähr 10-15 Tage konstant; bis dahin muß ein Trocknungsvorgang beendet sein.

Das gefriergetrocknete Präparat ist sehr hygroskopisch und wird deshalb anschließend noch unter Vakuum in Wachs eingebettet. Dafür wird das vorher entgaste Wachs auf +52 bis $+55^{\circ}$ C aufgeheizt und das Gewebe mit Wachs imprägniert.

In Abb. 7. wird die graphische Darstellung des Temperaturverlaufes im Gewebe während der verschiedenen Phasen des Gefriertrocknungsprozesses gezeigt.

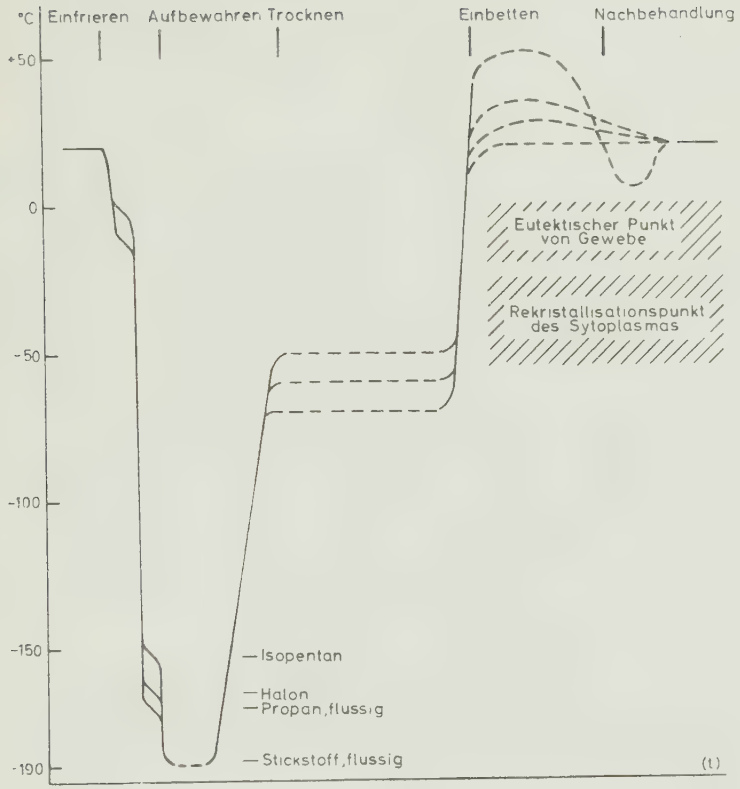


Abb. 7.

Graphische Darstellung des Temperaturverlaufes im Gewebe während der verschiedenen Phasen des Gefriertrocknungsprozesses.

Herstellung der mikroskopischen Präparate

Als Einbettungsmedium wurde Esterwachs 1960 verwendet (Steedman, 1960). Das Esterwachs eignet sich besonders gut für das Schneiden der chitinhaltigen Insekten. Die Köpfe wurden bei +55° C über mindestens eine Nacht im geschmolzenen reinen Wachs gehalten. Diese verhältnismäßig lange Zeit ist wichtig, weil ohne normale, weniger viskose Zwischenstufen die vollständige Imprägnierung des Gewebes mit Wachs etwas länger dauert. Die Köpfe befanden sich während der gesamten Trocknungs- und Durchtränkungsphase in durchgelöcherten Gelatinekapseln, die numeriert und leicht zu hantieren waren.

Für das Einbetten wurden kleine Plexiglaszylinder benutzt, die einen abschraubbaren Aluminiumboden hatten. Die Zylinder wurden mit geschmolzenem Wachs gefüllt. Die Kapseln wurden geöffnet und die Fliegenköpfe jeder in einen eigenen mit Wachs gefüllten Zylinder hineingesteckt. Zum Erstarren des Wachses werden diese kleinen Gefäße mit ihren Metallboden auf vorgekühlte (-50° C) Aluminiumklötze gestellt. Durch den guten Wärmekontakt wird erreicht, daß das Wachs gleichmäßig von unten nach oben erstarrt.

Die Köpfe mußten ferner orientiert eingebettet werden, da eine bestimmte Schneidestellung gewünscht wurde. Für die Orientierung wurden die Median- und Hinterwandebenen als Bezugsebenen herangezogen.

Die Orientierung wurde während der Erstarrungsvorganges mit einer feinen Pinzette vorgenommen, die Hinterhauptsebene mit einem kleinen, aus dem Wachs herausragenden Papierstückchen markiert. Nach dem Erstarren des Wachses wird der Boden der kleinen Gefäße abgeschraubt und die Blöcke aus den Zylindern herausgeschoben, in viereckiger Form nach den markierten Ebenen geschnitten und auf einen Holzblock geklebt. In dieser Form war das Wachs noch ziemlich undurchsichtig und man konnte den Kopf nur andeutungsweise

im Block sehen. Deshalb wurde er noch einmal kurz auf +47° C (ca. 13-18 Min. je nach der Blockgröße) erwärmt, ohne ihn jedoch schmelzen zu lassen. Dabei wurde er durchsichtig und blieb auch in kaltem Zustand so. Auch die Schneideeigenschaften des Wachses wurden so besser. Die Reaktionen im Wachs beim Aufwärmen sind reversibel, jedoch nicht näher bekannt.

Die Köpfe wurden in der Hozizontalebene mit einem Reichert-Schlittenmikrotom geschnitten. Verwendet wurde ein D-Messer (Jung), wobei der Schneidewinkel ca. 9-11° je nach Zimmertemperatur war. Das Präparat wurde während des Schneidens die ganze Zeit mit einem Binokularmikroskop beobachtet und somit auch die Schnittqualität mit Sorgfalt geprüft.

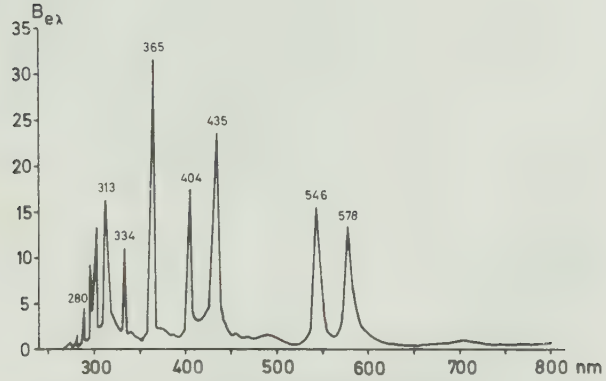
Die Schnittbänder oder einzelne Schnitte wurden auf dem Objektträger plaziert, auf den eine sehr dünne Schicht von Eiweiß-Glyzerin (1:1) gestrichen war. Das Ausbreiten der Schnitte wurde trocken mit einem feinen Pinsel und einer dünnen Wolframnadel unter dem Binokularmikroskop vorgenommen. Als die Schnittbänder glatt auf den Objektträgern lagen, wurden sie mit Hilfe einer Presse zwischen zwei Teflon-Platten fest auf den Objektträger gepreßt. Danach wurden die Objektträger kurz auf dem Wärmetisch auf +50° C aufgeheizt. Dann wurden auch die letzten Falten glatt und die Schnitte hafteten gut. Gleichzeitig wurde beobachtet, daß Luftbläschen, die sich noch unter den Schnitten befanden, verschwunden waren.

Das Wachs wurde mit Xylol entfernt (4 x 5 Min.). Es sind verschiedene Einschlußmittel möglich. Hier wurde Eukitt (O. Kindler, Deckglaszuschneiderei, Freiburg) verwendet, da es schnell erhärtet und eine geringe Autofluoreszenz hat.

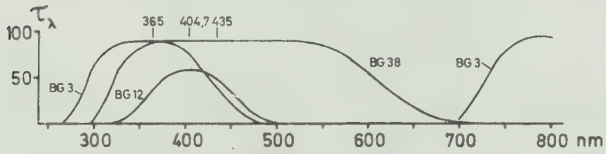
Fluoreszenzmikroskopie

Die Schnitte wurden gleich nach ihrer Herstellung betrachtet und aufgenommen, da die Farbe schnell ausbleicht. Die Lichtquelle war eine HBO 200 W Quecksilber-Höchstdrucklampe, aber auch die CSI 250 W Lampe wäre verwendbar. Für die Fluoreszenzanregung der Procion Yellow Farbe M-4R muß man die Linie 430-440 nm herausfiltern. Dafür wurden zwei verschiedene Erregerfilterkombinationen ausgesucht, entweder BG 3 und BG 38 oder BG 12. Hier wurde BG 12 benutzt. Die Sperrfilter wurden nach der Emissionslinie (550 nm) der Farbe ausgewählt. Von Ihnen sind drei verschiedene K 47, K 50 und K 53 möglich. Die Farbtönung ist Geschmackssache; K 50 wurde als beste Tönung empfunden.

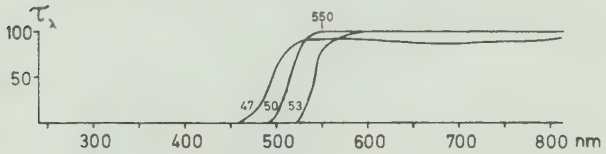
Das Mikroskop war ein Ultraphot III (Carl Zeiss, Oberkochen) und für die Fluoreszenz wurde der Auflicht-Illuminator Fl II und ein Planapo-25x-Objektiv verwendet. Die Aufnahmen wurden im Kleinbildformat auf den Farbdiafilm Kodachrome II, K 135-36P 15 DIN aufgenommen.



Spektrale Emission der Quecksilber-Hochstdrucklampe HBO 200W



Spektrale Transmission der Erregerfilter



Spektrale Transmission der Sperrfilter

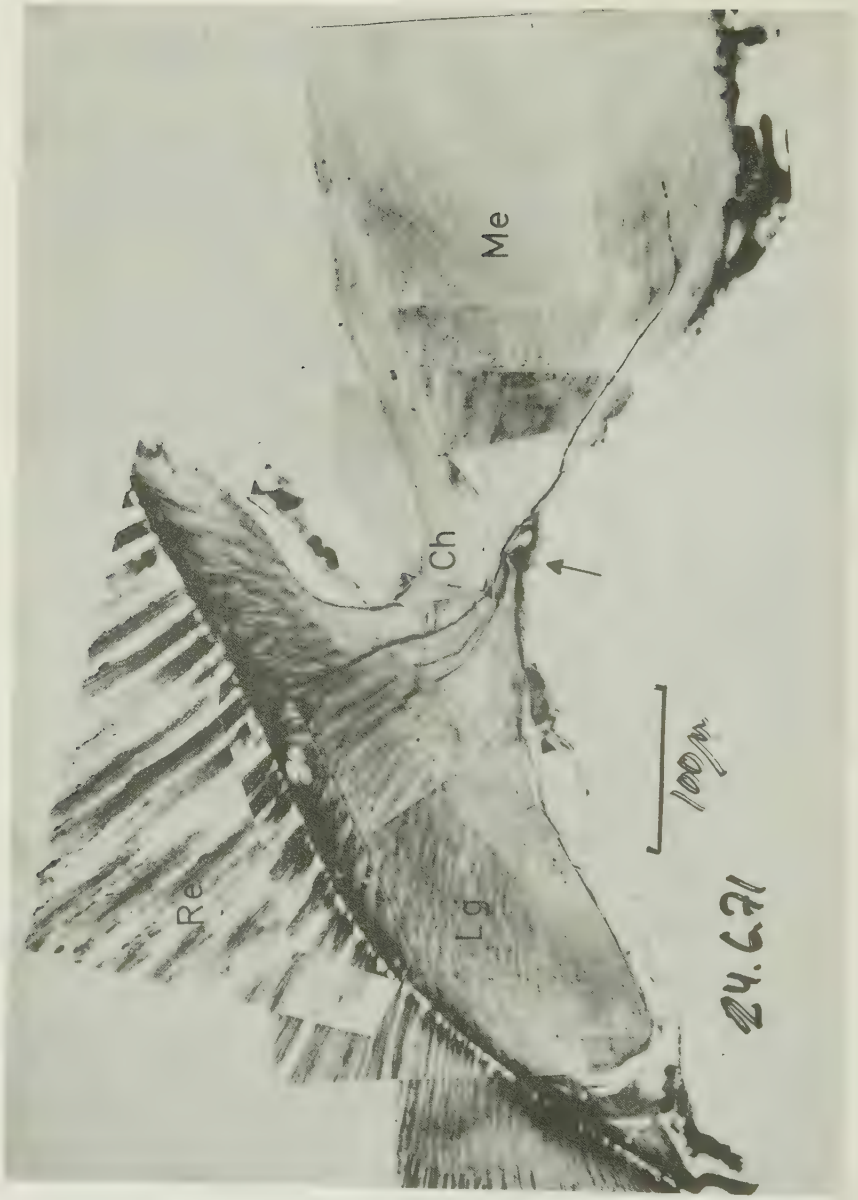


Abb. 9.
Eine Fotomontage von histologischen Schnitten. Die quer über das Bild ziehende lange Linie ist eine angefärbte 8. Sehzelle. Die Ableitstelle ist im Chiasma zu erkennen. Re Retinulaschicht, Lg Lamina ganglionaris, Ch Chiasma, Me medulla.

Die Identifizierung der Zelle und die Lokalisation der Ableitstelle

In Abb. 9. ist eine Fotomontage von histologischen Schnitten zu sehen, in denen jeweils ein Teil einer angefärbten Zelle liegt. Die Potentiale der 1. Serie von Abb. 11. stammen von dieser Zelle. Der Schnitt ist ein Horizontalschnitt, 10 µm dick, aus der Augenmitte. Die dunkle, lange Linie ist die Zelle, die angefärbt wurde. Sie fängt ungefähr in der Mitte der Retinulaschicht an, wo auch Kern und Soma liegen, und zieht durch die Basalmembran in die Lamina ganglionaris, von dort weiter über das Chiasma in die gegenüberliegende Seite der Medulla. Dort sind auch die synaptischen Endtrauben zu finden. Die Zelle wird aufgrund der Lage des Kerns und Somas als 8. Retinulazelle erkannt (Cajal und Sánchez, 1915). Die Ableitelektrode ist im Chiasma ca. 200 µm von der Basalmembran entfernt erkennbar. Der Axon der Zelle ist 500 µm lang und nur ca. 1 um dick.

Potentialformen

Abb. 11. zeigt in verschiedenen Versuchen gemessene Potentialserien. Die Lichtintensität wurde in einem Bereich von ca. 5 Zehnerpotenzen variiert. Zwischen jeder Belichtung wurde eine Dunkelpause von 1/2 Min. eingelegt. Der rechteckförmige Lichtreiz war 200 ms lang. Mit dem Zweistrahloszillograf wurden zwei verschiedene Strahlablenkgeschwindigkeiten registriert. Die schnellere Geschwindigkeit zeigt nur die Anfangsphase der Antwort.

Die Messungen wurden immer mit der kleinsten Intensität begonnen, und nach dem Ende der Messerie wurde noch einmal die kleinste Lichtintensität als Test gegeben. Wenn die Antwort die ursprüngliche Größe aufwies, war die Zelle noch in Ordnung und die aufgezeichneten Potentiale können als zuverlässig angesehen werden. Bei intrazellulären Ableitungen aus so dünnen Axonen treten gewisse experimentelle Schwierigkeiten auf. Abgesehen davon, daß man nur

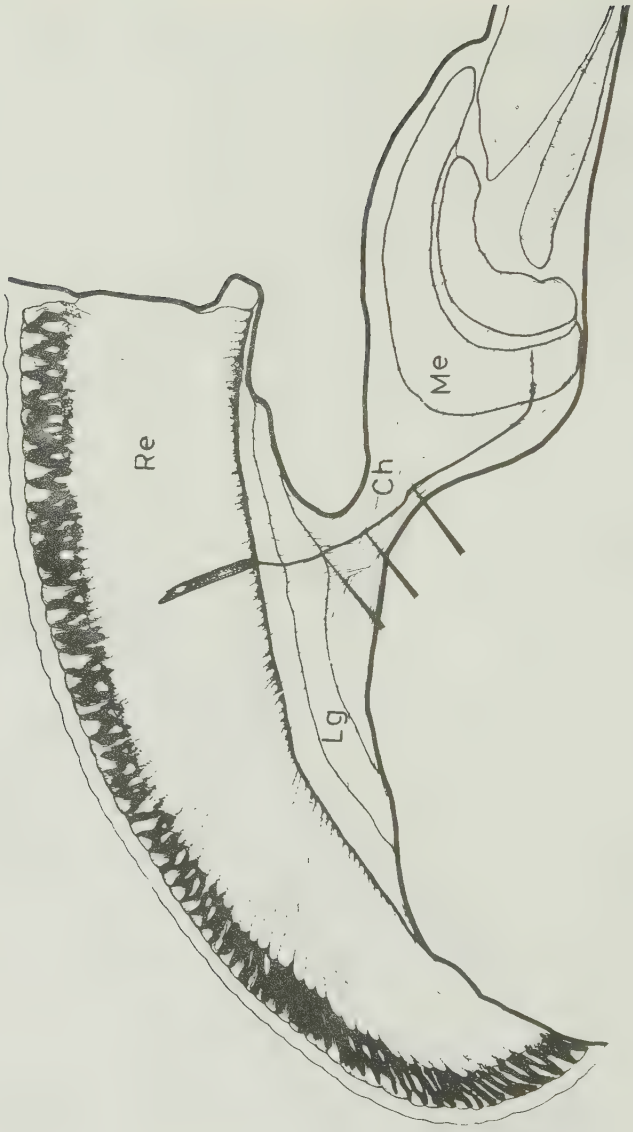


Abb. 10.

Schematische Zeichnung der Abb. 9. In der Zeichnung sind drei verschiedene Ableitstellen aus drei verschiedenen Versuchen markiert.

relativ selten mit der Elektrodenspitze einen solchen Axon trifft, sind die Ableitungen auch meistens nicht stabil und man beobachtet häufig während der Meßreihe eine Verkleinerung oder überhaupt ein Verschwinden der Potentiale.

Spike-Aktivitäten konnten nie festgestellt werden. Die Antworten waren immer langsame, depolarisierte Potentiale.

Die Ableitstellen der einzelnen in der Abb. 11 wiedergegebenen Potentialserien sind in der Zeichnung (Abb. 10) markiert. Die erste Potentialreihe stammt von einer Ableitstelle im Chiasma, die zweite von kurz vor dem Chiasma und die dritte aus der Laminanähe.

Bei höheren Intensitäten ist in den beiden ersten Reihen in der Anstiegsphase eine Zacke zu beobachten. In der dritten Spalte ist die Zacke nicht so deutlich zu sehen. Die Zacken sind möglicherweise ein Äquivalent zu dem bei Sehzellen von Drohnen und Fliegen (Calliphora) häufig beobachteten 'Spike' in der Anstiegsphase (Naka und Eguchi, 1962; Autrum und v.Zwehl, 1964; Bauman, 1968; Zettler und Järvilehto, 1970).

Auf das Maximum folgt ein Unterschwingen, das bei bestimmten Intensitäten am stärksten ausgeprägt ist; sowohl zu höheren als auch zu niedrigeren Intensitäten nimmt die Amplitude der Unterschwingphase ab. Die statische Phase des Belichtungspotentials zeigt bei niederen Intensitäten sehr starkes Rauschen (Fuortes und Yeandle, 1964; Kirschfeld, 1965). Das Nachpotential bleibt bei allen Potentialen positiv, bei höheren Intensitäten mehr, bei niederen weniger, und kehrt langsam zum Nullniveau (= Ruhepotential; -30 bis -60 mV) zurück.

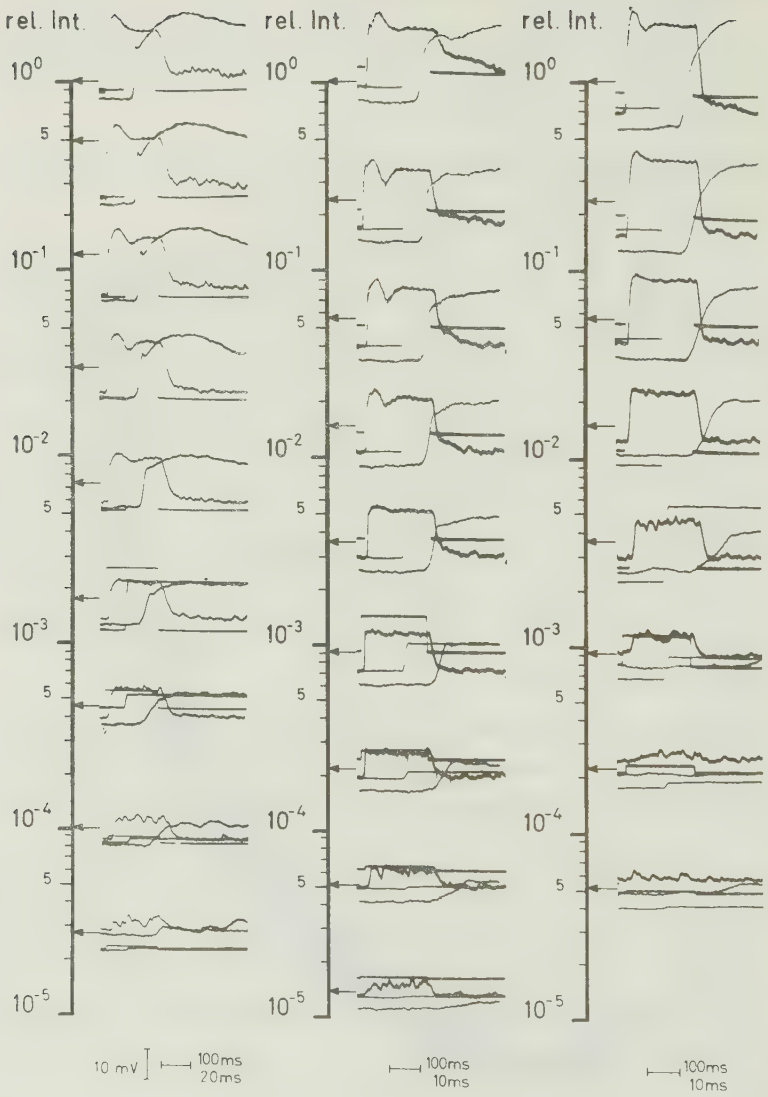


Abb. 11.

Belichtungspotentiale aus drei verschiedenen Ableitstellen der drei 8. Sehzellen. Die erste Reihe stammt von einer Ableitstelle im Chiasma, die zweite von kurz vor dem Chiasma und die dritte von der Nähe der Lamina.

Kennlinien

Die Abb. 12. zeigt die Intensität-Potential-Kennlinien aus den in der Abb. 11. gezeigten Potentialserien. Auf der Ordinate ist jeweils das Maximum der entsprechenden Belichtungspotentiale aufgetragen. Die Abszisse gibt die relativen Lichtintensitäten wieder, mit denen gereizt wurde. Dem Maximalwert 1 entspricht am Ort des Präparates eine Beleuchtungsstärke von 10.000 Lux. Gereizt wurde mit unbuntem Licht.

Die Zahl bei jeder Kennlinie gibt die Steigung des als Gerade approximierbaren Teiles in Millivolt pro 10 Intensitäts-Einheiten an. Die Kennlinien von verschiedenen Versuchen stimmen ziemlich gut überein. Sie sind verhältnismäßig gerade, ein S-förmiger Verlauf ist nur bei einer zu erkennen. Die Zahlen der verschiedenen Steigungen entsprechen ungefähr den Werten, die bei Sehzellen im proximalen Teil der Retinulaschicht und in der Lamina gemessen wurden (Zettler und Järvilehto, 1970).

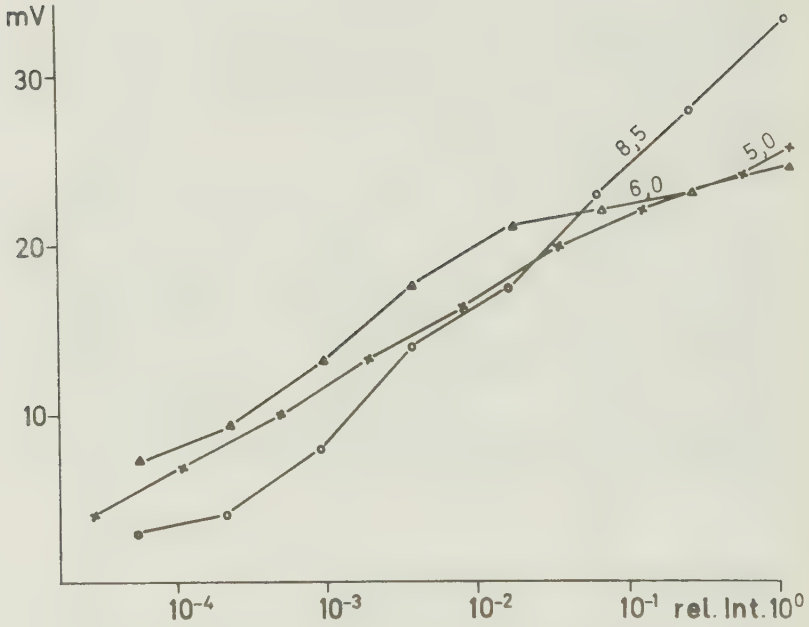


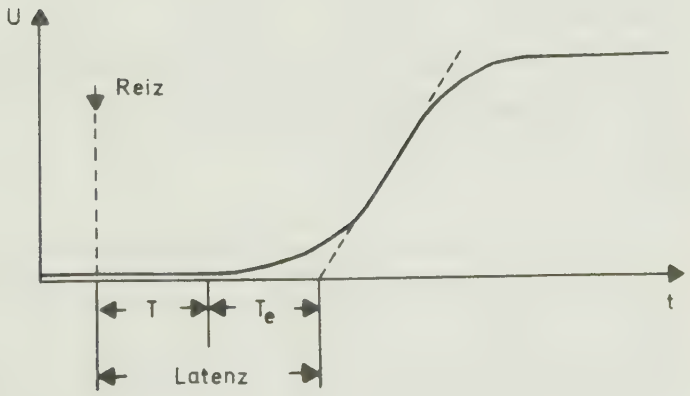
Abb. 12.

Intensität-Amplitude-Kennlinien aus den in Abb. 11. gezeigten Potentialserien. In der Reihenfolge der Serien wurden die Symbole x, △ , o verwendet. Die Ordinatenwerte sind Maximalwerte der jeweiligen Potentiale. Die Zahl bei jeder Kennlinie gibt die Steigung des als Gerade approximierbaren Teiles in Millivolt pro 10 Intens.-Einheiten an.

Latenzen

Unter Latenzzeit versteht man die Verzögerungszeit zwischen dem Beginn eines gesetzten Reizes und dem Beginn der beobachteten Reaktion (Burkhardt, 1969). Die schwache Stelle in der Definition liegt an der Bestimmung des Anfangspunktes der Reaktion. In der Literatur werden diese Punkte in den meisten Fällen ziemlich willkürlich festgelegt. In einer Arbeit wurden sogar gleichzeitig zwei verschiedene Definitionen benutzt (Shaw, 1968), je nach der verfolgten Absicht.

In dem technischen Sprachgebrauch ist der Begriff 'Latenz' gar nicht vorhanden, man verwendet statt dessen die Begriffe 'Totzeit' (T) und 'Ersatztotzeit' (Te) (Merz, 1970). Die Definition der Latenz durch diese Begriffe wird aus der Abb. 13. klar. Latenz würde in diesem biologischen System die Summe von Totzeit und Ersatztotzeit bedeuten.



Wenn man die Latenz so definiert, setzt das ein Totzeitglied voraus. Solche Annahmen wurden nach den Messungen des Übertragungsverhaltens einzelner Lichtrezeptoren gemacht (Zettler, 1969), obwohl das Glied, möglicherweise auch ein Verzögerungsglied höherer Ordnung (Kuiper und Leutscher-Hazelhoff, 1965), nicht näher bekannt ist.

Die in der Abb. 14 gezeigten Latenzen sind in der in Abb. 13 angegebenen Weise gemessen. Die Zeit der Latenz ist abhängig von der Intensität des Reizlichtes. Bei höheren Intensitäten ist sie ca. 6 ms und bei niederen ca. 16 ms.

Scholes (1969) findet für die Belichtungspotentiale der Sehzellen 1 - 6 verschiedene Latenzzeiten, je nachdem, ob er sie in der Retinulaschicht oder in der Lamina ableitet. Den Grund für den gemessenen Unterschied von 1-2 ms sieht er in der passiven Weiterleitung der Potentiale auf den Axonen der Sehzellen. Die Leitungsstrecke beträgt hier ca. 100 µm.

Die Potentiale aus den Axonen der 8. Sehzellen ergaben für die verschiedenen Ableitstellen keine zur Tiefe korrelierten Latenzzeitunterschiede, obwohl die Ableitstellen auch hier ca. 100 µm auseinander liegen.

Der Verlauf der Latenzzeiten mit der Intensität ist der gleiche, wie er auch sonst bei Sehzellen gefunden wird (Scholes, 1969; Mote, 1970; Shaw, 1968).

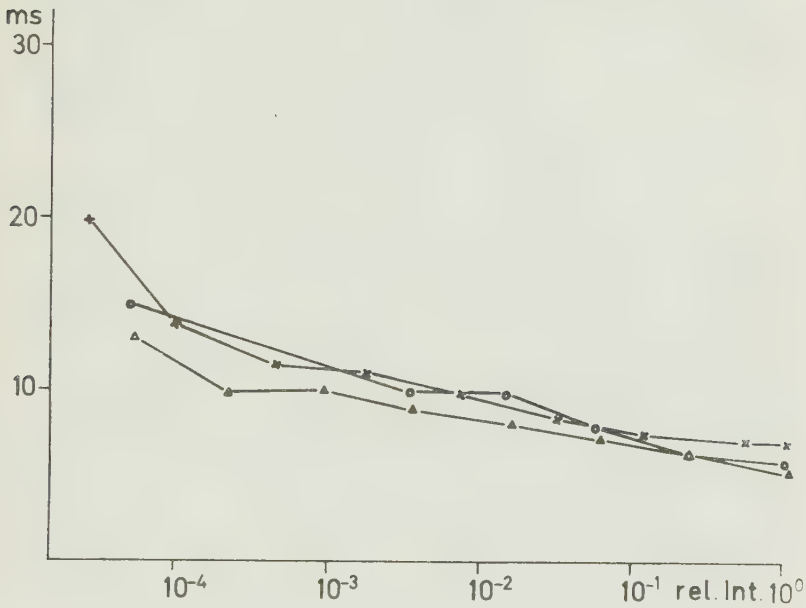


Abb. 14.

Latenz-Intensität-Kennlinien bei verschiedenen Versuchen.
Die Symbole wie in Abb. 12.

Winkelabhängigkeit

Die Winkelabhängigkeit wurde in der Äquatorebene gemessen, wobei zuerst die maximale Amplitude gesucht wurde. Dann wurde die Lichtquelle in Schritten von jeweils 1° oder 2° geschwenkt. Zwischen jeden Reiz wurde eine Dunkelpause von 20 sec eingelegt. Das Auge befand sich somit vor dem Testreiz immer im dunkeladaptierten Zustand. Die Messungen zur Winkelabhängigkeit der Belichtungspotentiale wurde bei einer Reizlichtintensität von $3{,}0 \cdot 10^{-2}$ relativen Einheiten durchgeführt. Der Divergenzwinkel der benachbarten, untersuchten Retinulazellen ist ca. $2{,}5\text{-}3^{\circ}$.

Die Größe des Öffnungswinkels φ_h wird definiert als der Winkel bei dem die maximale Potenitalamplitude auf 50% abgesunken ist (Washizu, Burkhardt und Streck, 1964). Die verschiedenen Kurven werden normiert, wobei der maximale Wert der Amplitude 100% beträgt. Abb. 15 zeigt zwei so erhaltene Kurven. Von beiden dargestellten Öffnungswinkeln der Sehfelder sind die zugehörigen Kennlinien in der Abb. 12 zu finden; zusammen gehörige Kurven sind durch gleiche Symbole gekennzeichnet.

Die eine Sehzelle hat einen φ_h-Wert von $8{,}5^{\circ}$ und die andere von $5{,}5^{\circ}$. Diese Werte entsprechen ungefähr denen, die sonst auch in der Literatur zu finden sind (Washizu, Burkhardt und Streck, 1964; Vowles, 1967; Zettler und Järvilehto, 1970).

Man nimmt an, daß die Änderung des Lichteinfallswinkels eine Änderung der auf eine bestimmte Retinulazelle fallende Lichtintensität verursacht. Stellt man also bei Schwenkung der Lichtquelle eine Änderung des Belichtungspotentials fest, so kann man diese Potentialänderung auf eine Änderung der wirksamen Lichtintensität zurückführen. Die in der Retinulazelle wirksame Lichtintensität kann mit Hilfe der Intensität-Amplituden-Kennlinie (Abb. 12) auf Empfindlichkeit der Sehzelle aus einer bestimmten Richtung um-

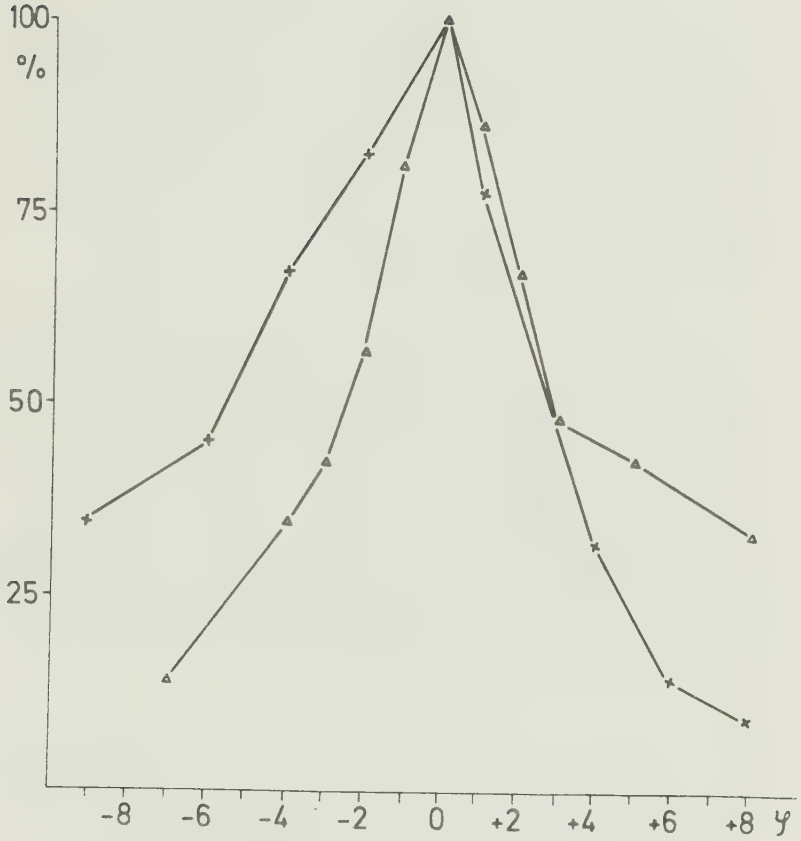


Abb. 15.

Potentialamplitude in Abhängigkeit vom Einfallswinkel des Reizlichtes. Die verschiedenen Kurven wurden normiert, wobei der maximale Wert der Amplitude 100% beträgt.

gerechnet werden. Die Umrechnung durch die Kennlinie ergibt einen engeren Kurvenverlauf (Abb. 16) und die so erhaltenen φ_h-Werte bei 50% sind wesentlich kleiner (1,1° und 2°) als die der Abb. 15. Diese sog. Richtungsempfindlichkeitskurven der Zellen zeigen die wirksame Intensität als Funktion des Lichteinfallswinkels. Die Empfindlichkeit in der Richtung maximaler Empfindlichkeit wird als 100% angesetzt. Die Auftragung auf die Ordinate erfolgt hier, im Gegensatz zu Washizu, Burkhardt und Streck (1964) und Scholes (1969) in logarithmischem Maßstab. Das hat den Vorteil, daß die Charakteristiken einzelner Kurven nicht bei niederen Intensitäten unauflösbar ineinanderlaufen.

Der enge Verlauf der Kurven gegenüber denen von den Sehzellen 1 - 6 findet seine Erklärung in der unterschiedlichen Größe der einzelnen Rhabdomere. Die elektronen-mikroskopischen Aufnahmen von Fernandez-Morán (1958) zeigen, daß die Rhabdomeren der 7. und 8. Sehzelle etwa um die Hälfte im Querschnitt kleiner sind als die der übrigen sechs. Dadurch ist auch der Öffnungswinkel der wirksamen Lichtintensität etwa um einen Faktor 2 kleiner als der bei den Sehzellen 1 bis 6 gemessene Mittelwert (Washizu, Burkhardt und Streck, 1964; Scholes, 1969).

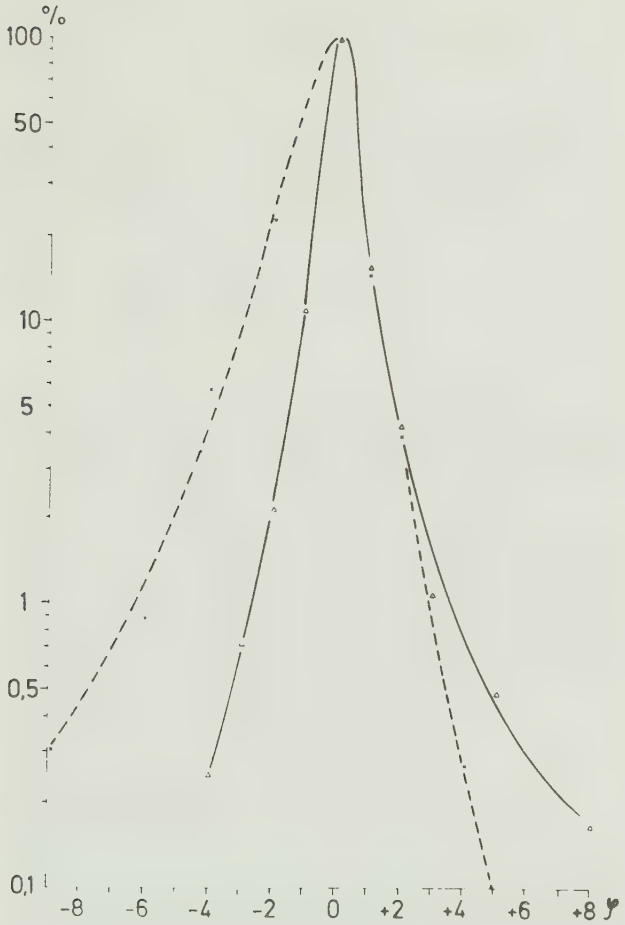


Abb. 16.

Die Kurven der Richtungsempfindlichkeit der Zellen zeigen die wirksame Intensität als Funktion des Lichteinfallswinkels. Diese Kurven werden aus denen der Abb. 15 durch Transformation durch die Kennlinie gewonnen.

Diskussion

Technische Probleme der Lokalisation

Die Markierung einer Zelle ist im Prinzip einfach, verlangt jedoch wegen der Kleinheit von Zellen und Elektroden eine gewisse manuelle Geschicklichkeit. Die eigentlichen Schwierigkeiten fangen erst dann an, nachdem die Farbe in die Zelle injiziert wurde. Dabei gibt es dreierlei Probleme: 1) unvollkommene Färbung der Zelle; 2) Ausdringen der Farbe aus der Zelle heraus; 3) zu viel Farbe im Gewebe.

Die unvollständige Färbung rührt meistens daher, daß der Farbe nicht genügend Zeit gegeben wurde, sich in der ganzen Zelle auszubreiten, und selten daher, daß zu wenig Farbe injiziert wurde. Auch sehr kleine Mengen von Farbe kann man noch nachweisen. In Abb. 9 sind z.B. außer der stark angefärbten 8. Sehzelle zwei andere schwächere Axone zu erkennen. Es handelt sich um zwei weitere 8. Sehzellen. Beim Beobachten mit dem Mikroskop kann man feststellen, daß die Zellen vollständig angefärbt sind. Die Färbung jedoch ist so schwach, daß man sie durch fotographische Methoden nicht vollkommen darstellen kann. Die Zellen sind sowohl in der Lamina als auch in der Medulla zu beobachten und durch die Unterschiede in der Farbintensität kann man sie voneinander trennen und verfolgen. Die Axone kreuzen im Chiasma und dann ist die Reihenfolge in der Lamina anders als in der Medulla.

Die Ableitungen aus den zwei schwach angefärbten Axonen waren nicht stabil. Die Elektrode wurde daraufhin weitergestochen. Erst die dritte Ableitung war so lange stabil, daß das Messprogramm voll durchgeführt werden konnte.

Die Ursache für die zwei weiteren Fehlerquellen ist der Injektionsstrom. Beim Einstechen muß man den Strom sparsam verwenden. Damit werden größere Farbflecken im Gewebe vermieden, die auch das Identifizieren der Zelle stören können.

Zu hoher Strom und zu schnelle Injektion können verursachen, daß die Farbe sich an einer Stelle der Zelle anhäuft oder aus der Zelle heraus dringt.

Probleme der Interpretation

Es ist natürlich wichtig, daß die Farbe die ganze Zelle ausfüllt. Erst dann kann man die Zellen zuverlässig identifizieren. Die Kriterien, nach denen die angefärbte Zelle als 8. Sehzelle identifiziert wurde, sind folgende:
Das Distalende der Zelle, das Soma, liegt in der Retinulaschicht. Die Länge des Somas reicht nur über die proximale Hälfte der Retinulaschicht. So kann man sie von der 7. Sehzelle unterscheiden, deren Soma in der distalen Hälfte liegt. Der Axon läuft durch die Lamina bis zur Medulla, also kann sie keine 1.-6. Sehzelle sein, deren Axone in der Lamina enden.

Problematik des Einfrierens lebender Zellen

Das Einfrieren des Präparates ist Voraussetzung, um die Elektrode verschiebungslos abzubrechen. Beim Einfrieren tauchen folgende Schwierigkeiten auf: Eiskristallbildung beim Einfrieren, Rekristallisation beim Konservieren und besonders beim Gefriertrocknen. Die Eiskristalle zerstören die strukturellen Einzelheiten des Präparates und erschweren die Zellidentifizierung und die Spitzenlokalisation.

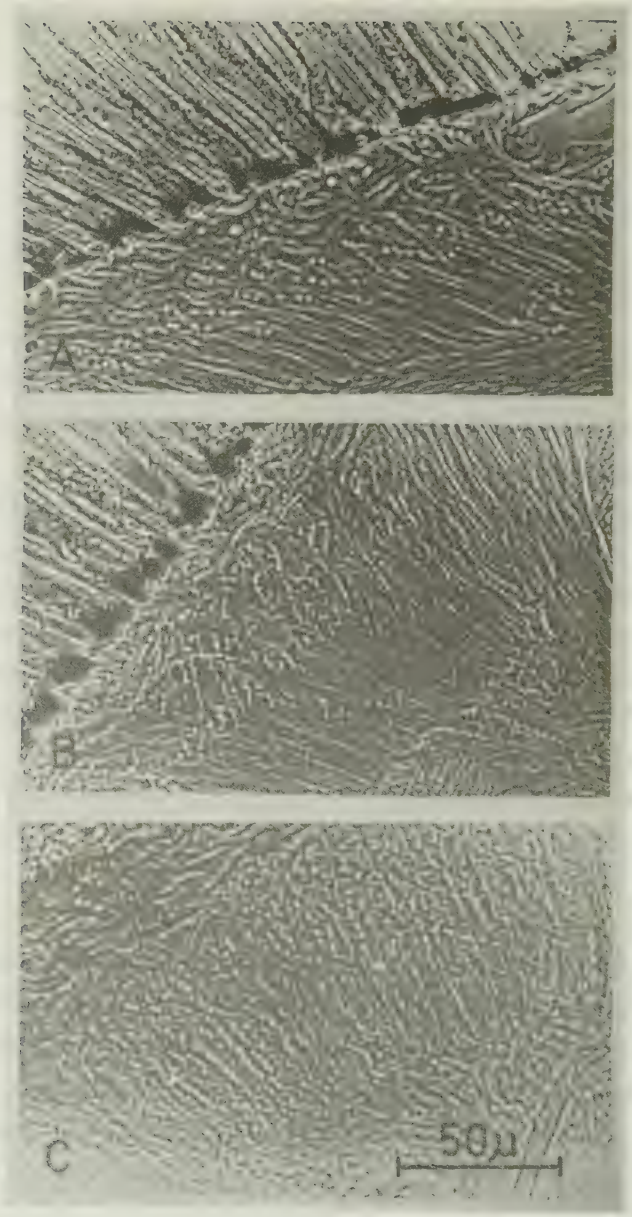


Abb. 17.

Der Einfluß der Gefriergeschwindigkeit auf die Eiskristallgröße. Das Präparat wurde mit verschiedenen Geschwindigkeiten eingefroren: A. schnelles Einfrieren, ca. 100°C/sec, B. mittlere Geschwindigkeit, ca. 1-10°C/sec, C. langsames Einfrieren, ca. 0,1°C/sec.

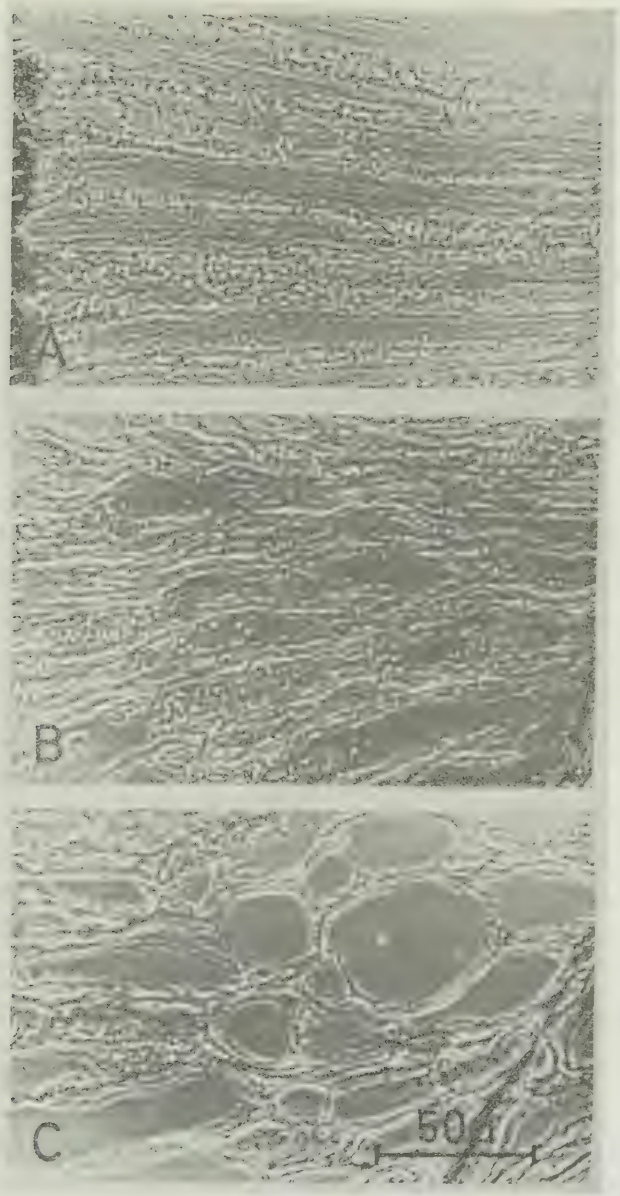


Abb. 18.

Einfluß der Rekristallisation im Gewebe der Insektenretina. Der Unterschied der Schnitte A, B und C hat eine Ursache in den verschiedenen Temperaturen bei denen die Präparate jeweils getrocknet wurden. Die großen Vakuolen (Bild B und C) sind Eiskristalle, die durch die Zellmembranen gewachsen sind.

In der Abb. 17 wird die Abhängigkeit der Eiskristallgröße von der Gefriergeschwindigkeit gezeigt. Bei allen Bildern ist das 1. optische Ganglion der Insektenretina zu sehen. Bei sehr schneller Gefriergeschwindigkeit (Bild A), ca. 100° C/sec, sind die Eiskristalle klein und kaum störend. Dagegen machen sie sich schon bei der mittleren Gefriergeschwindigkeit (Bild B), ca 1-10° C/sec, bemerkbar. Hier wäre es gerade noch möglich, die Zelle zu identifizieren. Bei sehr langsamen Gefriergeschwindigkeiten (Bild C), ca. 0,1° C/sec, sind keine Einzelheiten der Nervenfasern mehr zu erkennen. Die schnelleren Gefriergeschwindigkeiten können beim Einfrieren mit Halon ohne Schwierigkeit erreicht werden. Das Präparat darf jedoch nicht dicker als 1-2 mm sein.

Der Rekristallisationspunkt (siehe Abb. 7) ist bei verschiedenen Zellen etwas unterschiedlich. Er liegt zwischen -30 bis -60° C. Unterhalb dieser Grenze sind die Kristallisationsänderungen im Eis geringfügig, sie werden jedoch immer größer, je näher man an diesen Punkt kommt. Die Rekristallisationsänderungen können eine erhebliche Zerstörung der Gewebestrukturen verursachen. Deshalb muß das Präparat immer, beim Aufbewahren und Gefriertrocknen, unter dem Rekristallisationspunkt gehalten werden. Die Abb. 18 zeigt, wie sich z.B. das retinale Gewebe eines Insektenauges durch die Rekristallisation verändert. Die großen Vakuolen (Bild B und C) sind Eiskristalle, die durch die Zellmembranen gewachsen sind. Das Bild A zeigt, wie das Gewebe ohne Rekristallisationsveränderung aussieht.

In einigen Fällen ist es möglich, das Präparat durch Gefrierschutzmittel zu schützen, d.h. die Unterkühlbarkeit der Zelle zu erhöhen. Dafür gibt es eine Reihe Substanzen, die einfach den Gefrierpunkt des Zytoplasmas erniedrigen und damit die kritische Phase zwischen Gefrierpunkt und Rekristallisationspunkt abkürzen.

Die Frostresistenz auf natürlichem Wege zu erreichen, ist meist nicht möglich und häufig auch gar nicht wünschenswert, besonders dann nicht, wenn die Aktivität der metabolischen Reaktionen das Forschungsziel ist. Sehr oft wird deshalb als Frostschutzmittel 10-20%ige Glyzerin-Lösung verwendet; hierbei läßt man das Glyzerin das Präparat durchdringen. Das Einfrieren folgt dann wie üblich. Durch Gefrierätzversuche wurde festgestellt, daß die Zellmembranen Glyzerin gut vertragen können (Moore, 1964; Rebhun und Sander 1966).

In dieser Arbeit war jedoch die Anwendung von Gefrierschutzmitteln nicht möglich, weil an den Präparaten unmittelbar vor dem Einfrieren elektrophysiologische Ableitungen gemacht wurden. Die kleinen Eiskristalle, die durch Einfrieren gelegentlich entstehen konnten, störten die Identifizierung der betreffenden Zelle nicht.

Diskussion der Meßergebnisse

Die Ergebnisse der hier beschriebenen Versuche lassen sich in zwei wesentliche Punkte zusammenfassen:

1. die Belichtungspotentiale werden im Soma, wo sich das Photopigment befindet, erzeugt. Die Weiterleitung dieser Potentiale über die Sehzellenaxone zu höheren Stufen des Nervensystems erfolgt bei den hier untersuchten Zellen (8. Sehzelle) nicht über Spikes, sondern über langsame, graduierte Potentiale. Dies ist umso erstaunlicher, als der Axon der 8. Sehzelle bis zur Medulla reicht und eine Länge von 500 - 800 µm und einen Durchmesser von höchstens 1 um aufweist. Es kann ausgeschlossen werden, daß das Fehlen der Spikes auf einem methodischen Fehler beruht, da unter gleichen Versuchsbedingungen in der Medulla Spikes von beträchtlicher Höhe (10-15 mV) registriert werden konnten.

2. die in den Axonen der 8. Sehzellen registrierten Potentiale unterscheiden sich wesentlich von den Potentialen, die man in den Axonen der Sehzellen 1. - 6. registriert.
Die Ableitungen aus den Sehzellen 1 - 6 zeigen, daß das starke Rauschen bei niederen Intensitäten bei der Weiterleitung von der Retinulaschicht in die Lamina verschwindet (Järvilehto und Zettler, 1970) und daß die Potentialamplituden auf dieser relativ kurzen Strecke (ca. 100 µm) auf ca. ein sechstel absinken (Scholes, 1969). Im Unterschied hierzu verschwindet bei der 8. Sehzelle ganz offensichtlich das Rauschen nicht (Abb. 11) und auch die Potentialamplitude wird bei weitem nicht in diesem Ausmaß abgeschwächt. Selbst im Chiasma, 200 µm von der Basalmembran entfernt, wurden Potentialamplituden von 29 mV registriert.

Nimmt man an, daß das Belichtungspotential im Soma eine maximale Amplitude von 50 mV aufweist, so würde sich aus dieser Abschwä-

chung eine Längskonstante von 400 um ergeben. Errechnet manhieraus den Membranflächenwiderstand (spez. Widerstand des Axoplasmas = 50 Ohm·cm und Axonradius = 0,5 µm), so erhält man einen Wert von R_M = 3200 Ohm·cm^2. Dieser Wert liegt durchaus im Bereich von üblichen Literaturwerten (Florey, 1970).

Der im Soma der 8. Sehzelle angenommene Wert von 50 mV, gehört zu den höchsten Werten, die man bisher in der Retinulaschicht gemessen hat. Es ist jedoch anzunehmen, daß dieser Wert zu hoch geschätzt wurde.

Durch elektrophysiologische Messungen an den Sehzellen der Fliege wurden drei verschiedene Farbrezeptoren gefunden (Burkhardt, 1962). Langer (1966) konnte mit mikrospektrophotometrischen Methoden nachweisen, daß die Sehzellen 1 - 6 den von Burkhardt gefundenen Grün-Typ repräsentieren. Die beiden hintereinanderliegenden Rhabdomere der Sehzellen 7 und 8 konnte Langer nur gemeinsam durchstrahlen und nicht unterscheiden. Ihr gemeinsames Maximum liegt im Blau-Bereich. Das bedeutet, daß die 7. und 8. Sehzelle die von Burkhardt beschriebenen Gelb-grün- und Blau-Typen darstellen. Der Blau-Typ hat sein Empfindlichkeitsmaximum bei einer Wellenlänge von 350 nm. Die 8. Sehzelle kommt also immerhin mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% als Blau-Typ in Frage.

Das bedeutet aber, daß man damit rechnen muß, daß das im Soma erzeugte Belichtungspotential erheblich unter dem angenommenen Wert von 50 mV liegt, da das hier verwendete Reizlicht keinen UV-Anteil besitzt (Abb. 3). Da hier aber in einem Abstand von 200 µm von der Basalmembran mit Sicherheit noch ein Potential von 29 mV gemessen wurde, muß man eine erheblich größere Längskonstante und somit auch einen beträchtlich größeren Membranwiderstand fordern.

Zusammenfassung

Es werden Belichtungspotentiale aus den Axonen (1 µm Durchmesser) der 8. Sehzelle der Fliege Calliphora erythrocephala intrazellulär mit Glasmikroelektrode abgeleitet.

Die Identifizierung des Zelltyps erfolgt durch Farbmarkierung mittels Injektion von Procion-Yellow-Lösung in die Zelle. Der Nachweis der Ableitstelle wird durch den histologischen Nachweis der Elektrodenspitze erbracht. Ein schockartiges Einfrieren fixiert die Spitze im Gewebe. Anschließend wird das Präparat gefriergetrocknet, in Esterwachs eingebettet und geschnitten. Die angefärbte Zelle ist im Fluoreszenzmikroskop zu identifizieren. Die Problematik der Lokalisationsmethode wird ausführlich diskutiert.

Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die Information nicht in Spikes auf dem 500-800 µm langen Axon der 8. Sehzelle übertragen wird, sondern in langsamen, depolarisierenden Potentialen. Das Antwortpotential der 8. Sehzelle läßt sich in einem Reizbereich von 5 Zehnerpotenzen variieren.

Die Potentiale zeigen bei niederen Intensitäten starkes Rauschen. Dieses Rauschen ist sowohl in der Laminanähe als auch im Chiasma zu beobachten, es verschwindet also nicht mit zunehmender Entfernung von Zellsoma.

Die Intensitäts-Latenz-Kennlinien zeigen keine Abhängigkeit von der Ableittiefe. Die Latenzzeiten betragen etwa 6 ms bei den höchsten Intensitäten.

Die Winkelabhängigkeit des Antwortpotentials der 8. Sehzelle wird gemessen. Der Öffnungswinkel für die wirksame Lichtintensität ist etwa halb so groß, wie der der normalen Sehzellen 1-6.

Literaturverzeichnis

Autrum,H., Zettler,F., Järvilehto, M.: Postsynaptic potentials from a single monopolar neuron of the Ganglion Opticum I of the blowfly Calliphora. Z.vergl. Physiol. 70, 414-424 (1970).

Autrum,H., Zwehl,V.v.: Die spektrale Empfindlichkeit einzelner Sehzellen des Bienenauges. Z. vergl. Physiol. 48, 357 (1964).

Baumann, F.: Slow and spike potentials recorded from retinula cells of the honeybee drone in response to light. J. gen. Physiol. 52, 855-875 (1968).

Bentley,D.R.: A topological map of the locust flight system motor neurons. J. Insect Physiol. 16, 905-918 (1970).

Boschek,C.B.: On the fine structure of the peripheral retina and Lamina ganglionaris of the fly, Musca domestica. Z. Zellforsch. 118, 369-409 (1971).

Braitenberg,V.: Patterns of projektion in the visual system of the fly. I. Retina-Lamina projections. Exp. Brain Res. 3, 271-298 (1967).

Bullock, T.H., Horridge,G.A.: Structure and function in the nervous system of invertebrates. San Francisco: Freeman (1965).

Burkhardt,D.: Spectral sensitivity and other response characteristics of single visual cells in the arthropod eye. Symp. Soc. exp. Biol. 16, 86-109 (1962).

Burkhardt, D.: Wörterbuch der Neurophysiologie, Jena: Fischer Verlag (1969).

Cajal,S.R., Sánchez,D.: Contribución al conocimiento de los centros nerviosos de los insectos. Trab. Lab. Invest. Biol. (Madrid) 13, 1-168 (1915).

Davis,W.J.: Motoneuron morphology and synaptic contacts: determination by intracellular dye injection. Science 168, 1358-1360 (1970).

Dietrich,W.: Die Facettenaugen der Dipteren. Z. Zool. 92, 465-539 (1909).

Fernandez-Morán, H.: Fine structure of the light receptors in the compound eye of insects. Exp. Cell Res. Suppl. 5, 586-644 (1958).

Fernandez-Morán,H.: Low-temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid helium II. Ann. N. Y. Acad. Sci. 85, 689-713 (1960).

Florey,E.: Lehrbuch der Tierphysiologie, Stuttgart: Thieme (1970).

Fuortes,M.G.F., Yeandle,S.: Probability of occurrence of discrete potential waves in the eye of Limulus. J. gen. Physiol. 47, 443 (1964).

Gersh,I.: The Altmann-technique for fixation by drying while freezing Anat. Rec. 53, 309-337 (1932).

Horridge, G.A., Meinertzhagen,I.A.: The exact neural projektion of the visual fields upon the first and second ganglia of the insect eye. Z. vergl. Physiol. 66, 369-378 (1970).

Ioannides, A.C., Walcott,B.: Graded illumination potentials from retinula cell axons in the bug Lethocerus. Z. vergl. Physiol. 71, 315-325 (1971).

Järvilehto,M., Zettler,F.: Micro-localisation of laminalocated visual cell activities in the compound eye of the blow-fly Calliphora. Z. vergl. Physiol. 69, 134-138 (1970).

Kaneko,A., Hashimoto,H.: Recording site of the single cone response determined by an electrode marking technique. Vision Res. 7, 847-851 (1967).

Kaneko,A.: Physiological and morphological identification of horizontal,, bipolar and amacrine cells in goldfish retina. J. Physiol. 207, 623-633 (1970)

Kaneko,A.: Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina. J. Physiol. 213, 95-105 (1971).

Kirschfeld,K.: Discrete and graded receptor potentials in the compound eye of the fly (Musca). The functional organisation of the compound eye, p. 291-307. Oxford: Pergamon Press 1966.

Kuiper,J.W., Leutscher-Hazelhoff,J.T.: Linear and nonlinear reponses from the compound eye of Calliphora erythrocephala. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 30, 419-428 (1965).

Langer,H.: Spektrometrische Untersuchungen der Absorptionseigenschaften einzelner Rhabdomere im Facettenauge. Verh. Dtsch. Zool. Ges. Göttingen Suppl. 30, 329-338 (1966).

MacNichol,E.F.Jr., Svaetichin,G.: Electrical responses from the isolated retinas of fishes. Am.J.Ophthal. 46, 26-40 (1958).

Merz,L.: Grundkurs der Regelungstechnik. München: Oldenbourg (1970).

Milburn,N.S., Bentley,D.R.: On the dendritic topology and activation of cockroach giant interneurons. J. Insect Physiol. 17, 607-623 (1971).

Mitarai, G.: Determination of ultramicroelektrode tip potential in the retina in relation to S potential. J. Gen. Physiol. 43, 95-99 (1960).

Moor, H.: Die Gefrier-Fixation lebender Zellen und ihre Anwendung in der Elektronenmikroskopie. Z. Zellforsch. 62, 546-580 (1964).

Mote, M.I.: Focal recording of responses evoked by light in the Lamina ganglionaris of the fly Sarcophaga bullata. J. Exp. Zool 175, 149-158 (1970 a)

Mote, M.I.: Electrical correlates of neural superposition in the eye of the fly Sarcophaga bullata. J. Exp. Zool. 175, 159-168 (1970 b).

Mote, M.I., Goldsmith, T.H.: Compound eyes: Localization of two color receptors in the same ommatidium. Science 171, 1254-1255 (1971).

Naka, K., Eguchi, E.: Spike potentials recorded from the insect Photoreceptor. J. Gen. Physiol. 45, 663 (1962).

Oikawa, T., Ogawa, T., Motokawa, K.: Origin of the so-called cone action potential. J. Neurophysiol. 22, 102-111 (1959).

Rebhun, L.I., Sander, G.: Freeze-substitution studies of glycerol impregnated cells. Proc. Sixth Int. Cong. Electr. Micr., Kyoto, ed. R. Uyeda, Maruzen Co. Ltd., Tokyo 2, p. 49-50, 1966.

Scholes, J.: The electrical responses of the retinal receptors and the lamina in the visual system of the fly Musca. Kybernetik 6, 149-162 (1969).

Shaw,S.R.: Organization of the locust retina. Symp. Zool. Soc. Lond. 23, 135-163 (1968).

Steedman,H.F.: Section cutting in microscopy. Oxford: Blackwell Sci. Publ. 1960.

Steiberg,R.H., Schmidt,R.: Identification of horizontal cells as S-potential generators in the cat retina by intracellular dye injection. Vision Res. 10, 817-820 (1970).

Sterc,J., Pilny,J., Petsche,H., Novakova,V.: Zur Frage der Markierung einzelner Nervenzellen durch Mikroelektroden. Experientia 24, 305 (1968).

Strausfeld,N.J.: Golgi studies on insects. Part II The optic lobes of Diptera. Phil. Trans. B 258, 135-223 (1970).

Stretton,O.A.W., Kravitz,E.A.: Neuronal geometry: Determination with a technique of intracellular dye injection. Science 162, 132-134 (1968).

Tiffe,H.W., Zelles,L., Paucksch,H., Ernst,D.E.W.: Quick-freeze fixation with halogenated hydrocarbons. Exptl. Cell Res. 63, 207 (1970).

Thomas,R.C., Wilson,V.J.: Marking single neurons by staining with intracellular recording microelectrodes. Science 151, 1538-1539 (1966).

Trujillo-Cenoz,O., Melamed,J.: On the fine structure of the photoreceptor - second optical neuron synapse in the insect retina. Z. Zellforsch. 59, 71-77 (1963).

Trujillo-Cenoz,O.: Some aspects of the structural organization of the intermediate retina of Dipterans. J. Ultrastruct. Res. 13, 1-33 (1965).

Trujillo-Cenoz,O., Melamed,J.: Light and electronmicroscope study of one of the systems of centrifugal fibers found in the lamina of Muscoid flies. Z. Zellforsch. 110, 35-349 (1970).

Vowles,D.: The receptive fields of cells in the retina of the housefly Musca domestica. Proc. Roy. Soc. B 164, 552-576 (1966).

Washizu,Y., Burkhardt,D., Streck,P.: Visual field of single retinula cells and interommtidial inclination in the compound eye of the blowfly Calliphora erythrocephala. Z. vergl. Physiol. 48, 413-428 (1964).

Werblin, F.S., Dowling,J.E.: Organization of the retina of the mudpuppy, Necturus maculosus. II Intracellular recording. J. Neurophysiol. 22, 339-355 (1969).

Zettler,F.: Die Abhängigkeit des Übertragungsverhaltens von Frequenz und Adaptationszustand; gemessen am einzelnen Lichtrezeptor von Calliphora erythrocephala. Z. vergl. Physiol. 64, 432-449 (1969).

Zettler,F.: Kalt gefüllte Mikroglaskapillaren und ihre elektrophysiologisch relevanten Eigenschaften. Z. vergl. Physiol. 67, 423-435 (1970).

Zettler,F., Järvilehto,M.: Histologische Lokalisation der Ableitelektrode. Belichtungspotentiale aus Retina und Lamina bei Calliphora. Z. vergl. Physiol. 68, 202-210 (1970).

Lebenslauf

von Matti Järvilehto

geboren am 19.1.1945 in Helsinki

Volksschule 1952-1956

Gymnasium 1956 - 1964

Reifeprüfung am Normallyzeum in Oulu 30.5.1964

Militärpflicht 15.10.1964 - 15.9.1965

Biologiestudium angefangen an der Universität Oulu 15.9.1965

Folgende Examen abgelegt: Cand. rer. nat. 11.12.1969

Cand. phil. 1.10.1970

Hauptfach: Zoologie

Als Assistent im med.-mikrobiologischen Institut der Universität Oulu 1.6. - 31.7.1967 und 1.5. - 31.8.1968

Als Assistent im zoologischen Institut der Universität Oulu 25.1. - 25.3.1967

Leitung eines elektrophysiologischen Praktikums im zoologischen Institut der Universität Oulu 22.3. - 20.4.1971

Als Stipendiat (DAAD) im zoologischen Institut der Universität München 1.10.68 - 31.12.1969

Seit Winter-Sem. 1968 eingeschrieben an der Universität München in der Fachrichtung Biologie.

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am zoologischen Institut der Universität München bei Dr. F. Zettler im Rahmen einer Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft seit 1.1.1970.